

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. Juli 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/051987 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 5/06,  
A01K 67/027, G01N 33/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15337

(22) Internationales Anmeldedatum:  
27. Dezember 2001 (27.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 65 352.9 27. Dezember 2000 (27.12.2000) DE  
101 36 702.3 27. Juli 2001 (27.07.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): AXIOGENESIS AG [DE/DE]; Auerstrasse 4, 50733  
Köln (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FLEISCHMANN,  
Bernd [DE/DE]; Kerpener Strasse 2, 50937 Köln (DE).  
BOHLEN, Heribert [DE/DE]; Auerstrasse 4, 50733  
Köln (DE). HESCHELER, Jürgen [DE/DE]; Eckdör-  
fer Strasse 7, 50968 Köln (DE). KOLOSSOV, Eugen  
[DE/DE]; Franz-Hitze-Strasse 1, 50672 Köln (DE).

(74) Anwalt: BEHNISCH, Werner; Reinhard, Skuhra, Weise  
& Partner GbR, Postfach 41 01 51, 80750 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/051987 A1

(54) Title: SYSTEM FOR THE CELL-SPECIFIC AND DEVELOPMENT-SPECIFIC SELECTION OF DIFFERENTIATING EM-  
BRYONIC STEM CELLS; ADULT STEM CELLS AND EMBRYONIC GERMLINE CELLS

(54) Bezeichnung: SYSTEM ZUR ZELL-UND ENTWICKLUNGSSPEZIFISCHEN SELEKTION DIFFERENZIERENDER EM-  
BRYONALER STAMMZELLEN; ADULTER STAMMZELLEN UND EMBRYONALER KEIMBAHNZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a system for selecting differentiating embryonic or adult stem cells or embryonic germline  
cells in a cell-specific and development-specific manner, using a combination of resistance genes and detectable reporter genes under  
the common control of a cell-specific and/or development-specific promoter.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung offenbart ein System zur zell- und entwicklungs-spezifischen Selektion von  
differenzierenden embryonalen oder adulten Stammzellen oder embryonaler Keimbahnzellen durch kombinierte Anwendung von  
Resistenz- und detektierbaren Reportergenen unter gemeinsamer Kontrolle eines zell- und/oder entwicklungs-spezifischen Promotors.

## SYSTEM ZUR ZELL- UND ENTWICKLUNGSSPEZIFISCHEN SELEKTION

5 DIFFERENZIERENDER EMBRYONALER STAMMZELLEN; ADULTER  
STAMMZELLEN UND EMBRYONALER KEIMBAHNZELLEN

Die Erfindung betrifft rekombinante embryonale Stammzellen,  
10 embryonale Keimbahnzellen und adulte Stammzellen, die sowohl  
ein Gen für ein nicht zellschädigendes, detektierbares Prote-  
in als auch ein Resistenzgen enthalten, Verfahren zur Her-  
stellung dieser Zellen sowie weitere Ausgestaltungen.

15 Die in vitro Kardiomyogenese in der Kultur differenzierender  
embryonaler Stammzellen (ES) wurde als unbegrenzte Quelle von  
Herzmuskelzellen zur Transplantation in der Ersatztherapie  
des irreversibel geschädigten Herz-Gewebes vorgeschlagen  
(Klug et al., 1996). Eines der wesentlichen Hindernisse zur  
20 praktischen Ausführung dieses Ansatzes ist die relativ gerin-  
ge Ausbeute an differenzierten, von ES abstammenden Herzmus-  
kelzellen, die normalerweise nicht mehr als 1-3% einer diffe-  
renzierenden ES-Zell-Gesamtpopulation ausmachen (Muller M. et  
al., 2000).

25

Darüber hinaus stellen die noch existierenden nicht differen-  
zierten ES-Donorzellen in späteren Stadien der Differenzie-  
rung für den Empfänger eine potentielle Bedrohung bezüglich  
der Entwicklung von Tumoren dar. Deswegen wird die Aufgabe  
30 der Entwicklung eines wirksamen und hochspezifischen Selekti-  
onsverfahrens als einer der Ecksteine in der Zell-Therapie  
von Herzerkrankungen betrachtet.

Es wurde bereits früher dargestellt, daß eine mit Herzmuskelzellen angereicherte Population erfolgreich aus genetisch modifizierten ES-Zellen selektiert werden kann, die stabil mit einem Transgen eines  $\alpha$ -Herz-Myosin-schwere-Kette-Promotor gesteuerten Arzneistoff-Resistenzgens der Aminoglykosid-Phosphotransferase ( $\alpha$ -MHC-Neo) transfiziert wurden. (Klug et al., 1996). Diese Arbeit zeigte weiterhin potentielle Probleme für die Entwicklung dieses Ansatzes für ein wirksames Verfahren in großem Maßstab:

a) Die Behandlung durch einen selektiven Arzneistoff (G418) wurde bezüglich einer adhärennten Kultur differenzierender ES-Zellen durchgeführt, wohingegen, unter dem Gesichtspunkt der Effektivität ebenso wie der technologischen Durchführbarkeit, der optimale Ansatz eine Aufbringung des selektiven Arzneistoffs direkt auf die Suspension der Aggregate von ES-Zellen - embryoiden Körpern (embryoid bodies = EBs) (Wobus et al., 1991) sein würde.

b) Die weiteren Experimente bezüglich des Einfügens genetisch selektierter Zellen in die Herzen von Empfängertieren werden durch die Arbeit signifikant kompliziert, das Schicksal der Einfügungen bei Fehlen spezifischer Lebens-Marker für Donorzellen nachzuweisen.

Die DE - A - 19727962 beschreibt embryonale Stammzellen nicht-menschlicher Säuger, die mit einem DNA-Konstrukt stabil transfiziert sind, welches eine DNA-Sequenz aufweist, die für ein nicht-zellschädigendes fluoreszierendes Protein kodiert, wobei diese DNA-Sequenz unter Kontrolle eines zell- und/oder entwicklungsabhängigen Promotors steht (Kolossoff et al., 1998). Derartige rekombinante ES-Zellen weisen die nachfolgenden Nachteile auf:

1. Zwar können mit dieser Methode spezifische Zelltypen *in vivo* dargestellt werden, trotzdem gestaltet sich die Aufreinigung dieser vital gefärbten Zellen als sehr schwierig. Dies ist einerseits damit zu erklären, daß die Zellen von Interesse (z.B. Kardiomyozyten) nur ca. 1-3% der in EBs generierten Zellen ausmachen. Andererseits sind Zellaufreinigungsverfahren (z.B. fluorescence activated cell sorting, FACS) ideal für immunologische Zellen geeignet. Bei der Aufreinigung z.B. von Kardiomyozyten gehen jedoch viele Zellen zugrunde bzw. werden irreversibel geschädigt.

2. Ferner zeigt sich mit der Hygromycin-Aufreinigungsmethode an plattierten EBs, daß die nicht Hygromycin resistenten Zellen selbst nach 7-14tägiger Selektion nur schwer entfernt werden können. So kommt es nach der Transplantation trotz des zuvor erfolgten Einsatzes von Hygromycin als Selektionsmarker ebenfalls zur Tumorgeneration. Ähnliches gilt auch für eine Selektion mit Neomycin.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues System zur Selektion bzw. Auswahl von Zellen aus einer differenzierenden Kultur embryonaler Stammzellen, embryonaler Keimbahnzellen und adulter Stammzellen bereitzustellen, das die vorstehend beschriebenen Probleme vermeidet. Unter „System“ ist eine Kombination von Selektionsverfahren, Zellen und Verwendung dieser Zellen und Verfahren insbesondere im medizinischen Bereich zu verstehen, wie sie in der vorliegenden Anmeldung beschrieben wird. Diese Aufgabe wird durch embryonale Stammzellen, embryonale Keimbahnzellen und adulte Stammzellen nach Anspruch 1 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den dem Anspruch 1 nachfolgenden Patentansprüchen beschrieben.

Die Erfindung offenbart ein System für eine zell- und/oder  
entwicklungsspezifische Selektion differenzierender embryona-  
ler Stammzellen, embryonaler Keimbahnzellen und adulter  
Stammzellen durch kombinierte Anwendung von (Arzneistoff-)  
5 Resistenz- und detekierbaren Reportergenen unter gemeinsamer  
Kontrolle eines zell- und/oder entwicklungsspezifischen Pro-  
motors.

Die vorliegende Erfindung wird zunächst allgemein und an-  
10 schließend an Hand von Beispielen auf Grundlage der geneti-  
schen Selektion von Herzzellen aus einer differenzierenden  
Kultur embryonaler Stammzellen beschrieben, die mit zwei Ar-  
ten von Vektoren stabil transfiziert werden. Es wird betont,  
daß die Erfindung nicht auf diese spezielle Ausführungsform  
15 beschränkt ist, sondern aufgrund der Pluripotenz der Stamm-  
zellen bzw. Keimbahnzellen auf alle 3 Keimblatt-abgeleiteten  
Zelltypen, d.h. Endoderm, Mesoderm und Ektoderm und die sich  
hiervon ableitenden Zelltypen, anwendbar ist. Der Fachmann  
ist in der Lage, die Erfindung im Rahmen der beigefügten An-  
20 sprüche unter Berücksichtigung der nachfolgenden Beschreibung  
und seines allgemeinen Fachwissens zu variieren.

Erfindungsgemäß wird in embryonale Stammzellen, embryonale  
Keimbahnzellen und adulte Stammzellen die Information für zu-  
25 mindest ein Resistenzgen und für zumindest ein detektierbares  
Reportergen, kodierend z.B. ein nicht zellschädigendes detek-  
tierbares Protein, eingeführt. Die Information für beide Gene  
kann auf einem oder zwei Vektoren verteilt vorliegen. Ent-  
scheidend ist, dass die Expression des Gens für das detek-  
30 tierbare, z.B. fluoreszierende Protein als auch für das Re-  
sistenzgen unter Kontrolle ein- und desselben Promotors  
steht.

- Erfindungsgemäß werden die Promotoren unter zellspezifischen Promotoren und entwicklungsspezifischen Promotoren ausgewählt. Unter zell- bzw. gewebespezifischen Promotoren versteht man solche, die in spezifischen Zellpopulationen bzw. Geweben aktiv sind. Hierzu gehören beispielsweise neuronale Zellen, Endothelzellen, Skelettmuskelzellen, Zellen des glatten Muskelgewebes sowie Keratinozyten. Insbesondere bevorzugt werden Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten).
- 10 Weitere Beispiele für gewebespezifische Promotoren sind solche, die in Gliazellen, hämatopoetischen Zellen, neuronalen Zellen, bevorzugt embryonalen neuronalen Zellen, Endothelzellen, Knorpelzellen oder Epithelzellen sowie Insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen aktiv sind. "Gewebespezifisch" ist
- 15 unter dem Begriff "zellspezifisch" zu subsumieren.

Beispiele für herzspezifische Promotoren sind: Nkx-2.5 (spezifisch für sehr frühe Kardiomyozyten bzw. mesodermale Vorläuferzellen, (Lints et al., 1993); Human-cardiac- $\alpha$ -Actin

20 (spezifisch für Herzgewebe, (Sartorelli et al., 1990), MLC-2V (spezifisch für ventrikuläre Herzmuskelzellen (O'Brien et al., 1993) und WO-A-96/16163).

Weitere Beispiele für nicht-herzspezifische Promotoren sind:

25 PECAM-1, FLK-1 (Endothel), Nestin (neurale Vorläuferzellen), Tyrosin-Hydroxylase-1-Promotor (dopaminerge Neurone), Smooth Muscle- $\alpha$ -actin, Smooth Muscle-Myosin (glatte Muskulatur),  $\alpha$ 1-Fetoprotein (Endoderm), Smooth muscle heavy chain (SMHC Minimal Promotor (spezifisch für glatte Muskelzellen,

30 (Kallmeier et al., 1995).

Unter einem entwicklungsspezifischen Promotor sind Promotoren zu verstehen, die zu speziellen Zeitpunkten während der Entwicklung aktiv sind. Beispiele für derartige Promotoren sind

der  $\beta$ -MHC Promoter, der während der Embryonalentwicklung im Ventrikel der Maus exprimiert wird und in der perinatalen Phase vom  $\alpha$ -MHC-Promotor ersetzt wird. NKx2.5, ein Promotor während der frühen Mesoderm/Herzentwicklung, Atrial-Natriuretic-Factor, ein Marker des frühembryonalen Herzens mit Ausnahme des Schrittmacherzentrums, der auch zu späteren Entwicklungszeiten herunter reguliert wird, Flk-1, ein Endothel-spezifischer Promotor, der während der frühen Vasculogenese aktiv ist, Intron 2-Segment des Nestin-Gens, das in neuronalen Vorläuferzellen (embryonalen Neuronen und Gliazellen) und adulten Gliazellen (teilweise noch teilungsfähig) exprimiert wird (Lothian and Lendahl, 1997).

Unter einem Promotor versteht man erfindungsgemäß einen DNA-Sequenzbereich, von dem aus die Transkription eines Gens gesteuert wird. Er umfaßt in einer Ausgestaltungsform zumindest eine Minimal-Sequenz, die stromaufwärts vom Startcodon gelegen ist und die Bindungsstelle für die RNA-Polymerase zur Initiation der Transkription umfaßt. Diese Minimal-Sequenz kann durch weitere funktionelle DNA-Abschnitte, insbesondere Enhancer, ergänzt werden. Es sind auch regulierende Elemente, die sich im Intronbereich befinden, und sich stromabwärts vom zu transkribierenden Gen befinden können, einsetzbar. Die Transkriptionsrate kann dann z. B. durch andere Enhancerelemente gesteuert werden, die per se keine Aktivität besitzen. Es sind auch Promotorkonstrukte einsetzbar, bei denen ein per se nicht konstitutiv aktives Element (heat shock protein enhancer) mit einem Enhancer-Segment des Gens, das aus dem Intron stammt, verwendet wird.

30

In einer weiteren Ausgestaltungsform der Erfindung werden entwicklungsspezifische Promotoren eingesetzt, die eine Selektion auf z.B. mesodermale Zellen ermöglichen. Einsetzbare Promotorelemente, welche die Transkription des Resistenzgens

und des Gens für das detektierbare Protein steuern, sind Nkx2.5-, ANF- und Brachyuria-Promotoren. Nach Detektion der das detektierbare Protein exprimierenden Zellen, bei denen es sich z.B. bei Verwendung mesodermal-spezifischer Promotoren um mesodermale Zellen handelt, wird das dem Resistenzgen entsprechende Selektionsmittel zugegeben und auf die mesodermalen Vorläuferzellen selektioniert. Durch die von einem gemeinsamen Promotorelement gesteuerte Transkription des Gens für das detektierbare Protein und des Resistenzgens können hochspezifisch nicht differenzierte Zellen, z.B. embryonale pluripotente Stammzellen, abgetötet und damit die Möglichkeit einer späteren Tumorentstehung erheblich reduziert werden. Die so gewonnenen mesodermalen Zellen können dann in das entsprechende Gewebe implantiert werden und differenzieren dort weiter, beispielsweise nach Implantation in ein vorgeschädigtes, Herzareal zu Herzzellen. Diese Vorgehensweise ermöglicht zum einen die Produktion großer Mengen aufgereinigter Vorläuferzellen und zum anderen nach Implantation eine weitere Differenzierung unter nativen Bedingungen.

20

In ähnlicher Weise ist es möglich, unter Verwendung endodermal oder ektodermal spezifischer Promotoren auf endodermale oder ektodermale Zellen zu selektionieren.

25 Beispiele für mesodermale Zellen sind alle Muskelzelltypen (Herzmuskel-, Skelettmuskel- und glatte Muskelzellen), hämatopoetische Zellen und Endothelzellen,. Beispiele für ektodermale Zellen sind Hautzellen, Neurone und Gliazellen; Beispiele für endodermale Zellen sind Epithelzellen des Magen-  
30 Darmtraktes.

Bei Einsatz der für die oben genannten Zelltypen spezifischen Promotoren erfolgt bei Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Zellen eine hochspezifische



Entwicklung zu diesen endodermalen, ektodermalen bzw. mesodermalen Zellen und Geweben, wobei durch die von ein und demselben Promotor gemeinsam gesteuerte Expression des Reportergens und des Resistenzgens ein Höchstmaß an Sicherheit durch gewährleistet wird, daß einerseits die undifferenziierten pluripotenten embryonalen Stammzellen, andererseits aber auch andere Gewebetypen abgetötet werden.

Erfindungsgemäß kodiert das Reportergen z.B. für ein nicht zellschädigendes detektierbares Protein, in einer Ausführungsform für ein fluoreszierendes Protein. Derartige nicht-zellschädigende fluoreszierende Proteine sind an sich bekannt. Gemäß der vorliegenden Erfindung kann das Green Fluorescent Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* (beschrieben in WO-A-95/07463, WO-A-96/27675 und WO-A-95121 191) und dessen Derivate "Blue GFP" (Heim et al., Curr. Biol. 6(2): 178-182 (1996) und Redshift GFP" (Muldoon et al.; Biotechniques 22 (1): 162-167 (1997)) verwendet werden. Besonders bevorzugt ist das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP). Weitere Ausgestaltungen sind das gelb und das cyan fluoreszierende Protein (YFP, CFP). Weitere fluoreszierende Proteine sind dem Fachmann bekannt und können, solange sie die Zellen nicht schädigen, erfindungsgemäß eingesetzt werden. Der Nachweis der fluoreszierenden Proteine erfolgt durch an sich bekannte Fluoreszenz-Nachweisverfahren.

Alternativ zu den fluoreszierenden Proteinen können, insbesondere bei in vivo-Anwendungen, auch andere detektierbare Proteine, insbesondere Epitope dieser Proteine, eingesetzt werden. Auch sind Epitope von Proteinen einsetzbar, die zwar per se eine Zelle schädigen können, deren Epitope allerdings nicht zellschädigend sind. Bevorzugt handelt es sich um an der Zelloberfläche lokalisierte Epitope, die einen einfachen Nachweis, z.B. über Fluoreszenzmarkierung bzw. bildgebende

Verfahren (Magnetpartikel) in Verbindung mit Antikörpern, ermöglichen. Derartige Proteine bzw. ihre Epitope werden bei in vivo-Anwendungen bevorzugt so ausgewählt werden, daß sie zum Wirt immunologisch kompatibel sind, d.h. keine Abstoßungsreaktionen induzieren. Bevorzugt werden auch transgene Epitope von Proteinen eingesetzt, die keine Anbindung an intrazelluläre Signalkaskaden besitzen, insbesondere Oberflächenepitope von CD8 oder CD4. Ein weiteres Beispiel sind Epitope von Rezeptoren. Wichtig ist, daß es sich um solche Proteine bzw. ihre Epitope handelt, die in der Zelle, z.B. der Herzzelle, die durch Differenzierung und Selektion aus den mit dem erfindungsgemäßen Vektor transfizierten Stammzellen bzw. Keimbahnzellen erhalten wurde, nicht vorkommen, d.h., nicht exprimiert werden. Verwendbar sind beliebige Proteine, die in der differenzierten und selektierten Zelle, z.B. der Herzzelle, nicht exprimiert werden oder transgene Epitope, die jeweils spezifisch detektierbar sind, also in der selektierten Zelle nicht exprimiert werden. Diese Proteine und Epitope werden auch als Zellmarker bzw. Zellmarkergene oder Reportergene bezeichnet. Der Nachweis dieser detektierbaren Proteine bzw. Epitope kann beispielsweise durch Antikörper erfolgen, die spezifisch an diese detektierbaren Proteine bzw. Epitope binden und die über z.B. Fluoreszenz-vermittelte Methoden oder bildgebende Verfahren identifizierbar sind. Ein Beispiel sind anti-CD8 oder anti-CD4-Fluoreszenz-konjugierte Zelloberflächenantikörper bzw. Eisenpartikel-konjugierte Antikörperkomponenten. Als zusätzliche Technik der Aufreinigung, die höchste Reinheitsgrade ermöglicht, bietet sich eine Zellsortierung an. Nachdem die gewünschten differenzierten Zellen nach Zugabe des Selektionsmittels, beispielsweise des Antibiotikums Puromycin, bereits hochgradig angereichert wurden, können die Zellen mittels MACS-Sortierung bis zu 99% weiter aufgereinigt werden.

Die embryonalen oder adulten Stammzellen und die embryonalen Keimbahnzellen liegen in einer bevorzugten Ausgestaltungsform der Erfindung in Form von Aggregaten vor, die als embryoide Körperchen bezeichnet werden. Die Figur 4 zeigt ein Protokoll, um embryoide Körperchen zu erhalten. Die Herstellung erfolgt bevorzugt mit der Methodik des "hängenden Tropfens" oder durch Methylzellulosekultur (Wobus et al., Differentiation (1991) 48, 172-182).

Alternativ hierzu können auch die „spinner flasks“ (Rührkulturen) als Kulturmethode eingesetzt werden. Hierfür werden die undifferenzierten ES Zellen in die Rührkulturen gebracht und nach einem etablierten Schema ständig durchmischt. Hierfür werden 10 Millionen ES Zellen in 150 ml Medium mit 20% FKS gebracht und konstant bei einer Geschwindigkeit von 20 r.p.m. gerührt, wobei regelmäßig die Richtung der Rührbewegung geändert wird. 24 Stunden nach Einbringen der ES Zellen werden zusätzlich 100 ml Medium mit Serum hinzugegeben und daraufhin jeden Tag 100 - 150 ml des Mediums ausgetauscht (Wartenberg et al., 2001). Unter diesen Kulturbedingungen können große Mengen an ES-Zell-abgeleiteten Zellen, u.a. Kardiomyozyten, Endothelzellen, Neurone u.s.w., je nach Zusammensetzung des Mediums, gewonnen werden. Entweder werden die Zellen mittels des Resistenzgenes noch in der Rührkultur bzw. nach Ausplattierung selektioniert.

Alternativ hierzu können die im hängenden Tropfen differenzierten EBs nicht plattiert, sondern einfach in Suspension gehalten werden. Selbst unter diesen Bedingungen konnte experimentell ein Fortschreiten der Differenzierung festgestellt werden. Erstaunlicherweise zeigte es sich jedoch, daß die Applikation des Resistenzgens noch sehr viel schneller zu einem kompletten Absterben der nicht-Kardiomyozyten führte und die verbleibenden Kardiomyozyten daraufhin spontan zu schlagen

beginnen. Dieser experimentelle Befund weist eindeutig darauf hin, daß Kardiomyozyten für das Überleben offensichtlich keine spezifischen Signale vom umgebenden Gewebe benötigen und ferner die Puromycin-selektionierten Kardiomyozyten funktionell intakt sind. Das Abwaschen der nicht-Kardiomyozyten ist ebenfalls deutlich erleichtert, da allein mit mechanischer Durchmischung bzw. niederkonzentrierter Zugabe von Enzymen (z.B. Kollagenase, Trypsin) eine Einzelzellsuspension mit leichtem Abwaschen der nicht-Kardiomyozyten erreicht wird.

10

Die embryonalen Stammzellen stammen von Säugetieren, insbesondere bevorzugt von Nagern, beispielsweise Mäusen, Ratten oder Kaninchen. Besonders bevorzugte ES-Zellen sind dabei D3-Zellen (Doetschman et al., 1985) (Doetschmann et al., J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27 (1985)), R1-Zellen (Nagy et al., PNAS (1995)), E14-Zellen (Handyside et al., Roux Arch. Develop. Biol. 198, 48 (1989)), CCE-Zellen (Bradley et al., Nature 309, 255 (1985)) (selbstverständlich sind auch andere ES Zellen einsetzbar, die bereits bekannt oder in Zukunft entwickelt werden) und P19-Zellen (dies sind Teratokarzinom-abgeleitete Zellen mit eingeschränkten Eigenschaften (Mummery et al., Dev. Biol. 109, 402 (1985))).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden embryonale Stammzellen von Primaten verwendet, wie sie beispielsweise von Thomson, J. A. et al., 1995 beschrieben wurden.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltungsform werden humane embryonale Stammzellen verwendet. Die Gewinnung dieser embryonalen Stammzellen ist bereits etabliert (Thomson JA et al., 1998). Hierfür wird aus der Blastozyste die innere Zellmasse gewonnen und auf Maus-Feederzellen plattiert. Nach erfolgreicher Propagation werden die Zellen „gesplittet“ und ihre Stammzell-Eigenschaften mittels RT-PCR auf spezifische

Stammzellgene, durch Immunhistochemie zur Identifizierung spezifischer Proteine und auf Stoffwechselprodukte analysiert. Der Stammzellstatus kann ferner durch die in vitro - Differenzierung in verschiedene Zelltypen und Propagation und  
5 Splittung über mehrere Passagen hinweg nachgewiesen werden.

Alternativ zu embryonalen Stammzellen eignen sich auch embryonale Keimbahnzellen (EG) (Shamblott MJ et al., 1998), die aus dem frühen Embryo gewonnen und in der Folgezeit wie embryonale Stammzellen kultiviert und differenziert werden können.  
10

Die Erfindung ist auch auf adulte Stammzellen anwendbar. Es wird hier auf die Literatur von Anderson et al., 2001, Gage, F.H., 2000 und Prockop, D.J., 1997, verwiesen, welche die Gewinnung und Kultur derartiger Zellen beschreibt.  
15

Resistenzgene sind an sich bekannt. Beispiele hierfür sind Nukleosid- und Aminoglykosid-Antibiotika-Resistenzgene, z.B. Puromycin (Puromycin-N-Acetyltransferase), Streptomycin, Neomycin, Gentamycin oder Hygromycin. Weitere Beispiele für Resistenzgene sind Dehydrofolat-Reduktase, die eine Resistenz gegen Aminopterin und Methotrexat vermittelt, sowie Multi-drug-Resistenzgene, die eine Resistenz gegen eine Anzahl von  
20 Antibiotika vermitteln, beispielsweise gegen Vinblastin, Doxorubicin und Actinomycin D. Besonders bevorzugt ist ein Konstrukt, welches eine Puromycin-Resistenz vermittelt. Die Ausdrücke Resistenzgen und Arzneistoff- bzw. Wirkstoff-Resistenzgen werden hier synonym verwendet und beziehen sich  
25 z.B. jeweils auf ein für eine Antibiotikum-Resistenz kodierendes Gen. Es können aber auch andere für Arzneimittel- bzw. Wirkstoff Resistenzen kodierende Gene eingesetzt werden, z.B. das DHFR-Gen.  
30

Anstatt der Resistenzgene können auch andere selektierbare Markergene eingesetzt werden, die eine spez. Selektion der das erfindungsgemäße Konstrukt enthaltenden Zellen ermöglichen und die, ohne das Überleben des Patienten zu beeinträchtigen, auch in vivo anwendbar sind. Geeignete Gene stehen hier dem Fachmann zur Verfügung.

Im ersten Ausführungsbeispiel liegen die Gene für das detektierbare Protein und das Resistenzgen auf zwei verschiedenen Konstrukten. Die Verwendung von zwei verschiedenen Vektoren, wobei auf dem ersten Vektor das Resistenzgen liegt und auf dem zweiten Vektor das Reportergen, beispielsweise EGFP, wobei beide von einem zell- bzw. gewebespezifischen oder entwicklungsspezifischen Promotor, beispielsweise dem  $\alpha$ -MHC-Promotor kontrolliert werden, weist die in der vorliegenden Anmeldung aufgezeigten vielfältigen Vorteile auf, die sich für bestimmte Anwendungszwecke eignen. Weitere Versuche zeigten aber, daß dieses System überraschenderweise auch mit gewissen Nachteilen verbunden ist, nämlich mit der Bildung von zwar gegen das Resistenzgen resistenten Zellen, innerhalb derer sich jedoch Zell-Subklone befinden, die das Reportergen, z.B. EGFP, nicht exprimieren, also z.B. EGFP-negativ sind. Derartige Subklone können eine potentielle Quelle für Teratokarzinome darstellen, da, auch bei Einsatz des Antibiotikums, nicht alle nicht-spezifischen Zellen, also z.B. nicht-Kardiomyozyten, abgetötet werden. Dies könnte dazu führen, daß schnell proliferierende ES-Zellen potentiell überleben und Tumore bilden können.

In den durchgeführten Versuchen zeigt es sich, daß in der Tat EGFP-negative Zellen auch nach einer Puromycin-Exposition von bis zu 15 Tagen überleben können. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung liegt darin, daß die eingesetzten zwei Vektoren in einer Doppel-Transfektion in die Zellen eingebracht

werden. Diese Vektoren integrieren dann zufällig im Wirtsgenom, teilweise an unterschiedlichen Stellen des nativen Genoms und können daher unter den Einfluß verschiedener Gene und ihrer Kontrollsequenzen geraten, die unterschiedliche  
5 Transkriptionsaktivitäten besitzen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung (Beispiel 2) wurden deshalb das Reportergen und das Resistenzgen auf einem Vektorkonstrukt unter Kontrolle eines Promotors angeordnet.  
10 Im vorliegenden Beispiel 2 wurden sowohl die Puromycinresistenzkassette (Pac) als auch das Reportergen EGFP unter gemeinsamer Kontrolle des gewebespezifischen Promotors  $\alpha$ -MHC gebracht. Der große Vorteil dieses Systems liegt in der sehr geringen Inzidenz von resistenten Zellen, die nicht zell- oder  
15 gewebe- oder entwicklungsspezifisch sind. Beispielsweise ist, die Wahrscheinlichkeit sehr gering, daß puromycinresistente Zellen auftreten, bei denen es sich nicht um Herzzellen handelt. Dies scheint darauf zurückzuführen zu sein, daß die Pac-Kassette und das EGFP-Gen nur an einer oder wenigen  
20 Lokalisationen des Wirtsgenoms integrieren und deshalb nicht dem Einfluß unterschiedlicher Aktivitätszustände der jeweiligen vor- bzw. nachgeschalteten Genstruktur unterliegen. Durch weitere Selektion der erhaltenen Klone ist es möglich, ein praktisch reines Zellsystem zu erhalten. Diese Evaluierung erfolgt unter Einsatz der EGFP-Expression. In diesem  
25 Zusammenhang wird nochmals darauf hingewiesen, daß es sich bei EGFP,  $\alpha$ -MHC und Pac um beispielhafte Ausgestaltungen der Erfindung handelt. Der Fachmann kann hier unter Berücksichtigung der in der vorstehenden Anmeldung beschriebenen Alternativen Abänderungen vornehmen.  
30

Das Einbringen des oder der Vektor-Konstrukte in die embryonalen Stammzellen erfolgt in an sich bekannter Weise, bei-

spielsweise durch Transfektion, Elektroporation, Lipofektion oder mit Hilfe viraler Vektoren.

5 Zur Selektion auf stabil transfizierte ES-Zellen enthalten die Vektor-Konstrukte ein weiteres selektierbares Markergen, welches beispielsweise eine Resistenz gegen ein Antibiotikum vermittelt, beispielsweise Neomycin. Selbstverständlich können auch andere, an sich bekannte Resistenzgene eingesetzt werden, beispielsweise die weiter oben i.V. mit dem für das  
10 fluoreszierende Protein kodierenden Gen beschriebenen Resistenzgene. Das zur Selektion auf stabil transfizierte ES-Zellen eingesetzte Selektions-Gen steht unter Kontrolle eines anderen Promotors als dasjenige, welcher die Kontrolle der Expression des detektierbaren Proteins reguliert. Häufig werden  
15 den konstitutiv aktive Promotoren eingesetzt, beispielsweise der ,PGK-Promotor.

Die Verwendung des zweiten Selektionsgens ist wichtig, um überhaupt die erfolgreich transfizierten Klone (Effizienz relativ niedrig) identifizieren zu können. Andererseits würde  
20 eine erdrückende Mehrzahl von nicht transfizierten ES-Zellen vorliegen und bei der Differenzierung z.B. keine EGFP positiven Zellen erkannt werden.

25 Nach Transfektion werden die Konstrukte stabil in die native DNA integriert. Nach Aktivierung intrazellulärer Signale, die entweder zellspezifischer und/oder entwicklungsspezifischer Natur sind, wird der Promotor aktiviert und es werden sowohl das detektierbare Protein als auch das (erste) Resistenzgen  
30 exprimiert. Es können damit nicht nur ES-Zellen z.B. anhand ihrer Fluoreszenz-Emission unter Fluoreszenzanregung erkannt werden, sondern es kann gleichzeitig und hoch-spezifisch auf diejenigen Zellen selektiert werden, die unter Kontrolle des zellspezifischen und/oder entwicklungsspezifischen Promotors



stehen. Mit dieser als elegant zu bezeichnenden Methode ist eine hohe Anreicherung spezifischer Zellen möglich, die in einem speziellen Entwicklungszustand aktiv oder die für spezifische Gewebe typisch sind. Ein besonders wichtiges Beispiel ist hier die Anreicherung von aus ES-Zellen stammenden Kardiomyozyten. Beispielfhaft werden die nachfolgenden Vorteile genannt:

1. Die Kontrolle sowohl des Resistenzgens als auch des entwicklungsspezifischen und/oder zellspezifischen Gens unter ein und demselben Promotor garantiert eine effiziente und schnelle Selektion der beispielsweise gewebespezifischen Zellen, also beispielsweise der Herzzellen. Anhand von FACS-Analysen konnte gezeigt werden, dass beinahe 99% aller nicht herzspezifischen Zellen abgetötet wurden. Dieser hohe Reinheitsgrad für einen spezifischen Zelltyp innerhalb einer hoch heterogenen Zellpopulation von embryoiden Körperchen ist auch ein geeignetes Werkzeug nicht nur für pharmakologische Tests auf toxische Substanzen, zur Wirkstofftestung, embryotoxikologische Effekte, Aus-  
testung von Faktoren zur Zellproliferation und Differenzierung, sondern eröffnet auch die Möglichkeit, hochreine Zellpopulationen für therapeutische Anwendungen zum Ersatz von Geweben bereit zu stellen bzw. die Generation von Gewebestücken in vitro (Bioengineering) zu generieren.
2. Obwohl das erfindungsgemäß bevorzugt angewandte Differenzierungsverfahren mit dem "hängenden Tropfen" Zellpopulationen mit relativ stabilen Differenzierungscharakteristika bei Plattierung ermöglicht, weisen embry-  
oide Körperchen gleichwohl sehr deutliche Unterschiede zum Zeitpunkt der Initiation der Differenzierung, u.a. auch des spontanen Schlagens, auf. Durch die Expression

z.B. des Fluoreszenzgens erhält man eine zuverlässige Information über die Initiation der Differenzierung, z.B. der Kardiomyogenese, und die Zugabe des Selektionsmediums kann zeitlich abgestimmt nach Initiation der Transkription vom zellspezifischen oder entwicklungsspezifischen Promotor erfolgen. Die erfindungsgemäße Kombination eines Gens, welches für ein detektierbares, z. B. für ein fluoreszierendes Protein, kodiert, mit einem Selektionsgen, wobei beide Gene unter Kontrolle eines Promotors stehen, ermöglicht somit eine genaue zeitliche Abstimmung der Zugabe des Selektionsmediums in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium der Zellen, wobei das Differenzierungsstadium über die Expression des fluoreszierenden Proteins vom Experimentator feststellbar ist. Unter in vivo Bedingungen ist die Verwendung des Reportergens nicht kritisch, da es sowieso nicht identifiziert werden könnte. Es ist aber von Bedeutung bei der experimentellen Austestung (sehr wichtig zur Etablierung von Aufreinigungs-, aber auch operativen Verfahren) der Methode, aber evtl. aufgrund der potentiellen Antigenität für therapeutische Zwecke nicht einzusetzen. Alternativ, besonders für therapeutische Zwecke, ist die Verwendung eines transgenen Epitops, das keine Anbindung an intrazelluläre Signalkaskaden besitzt (z.B. CD8 oder CD4), unter Kontrolle des zell- bzw. gewebespezifischen Promotors geeignet. Mit Hilfe dieser Technik können nach der Puromycin- Anreicherung hochaufgereinigte Kardiomyozytenpräparationen mittels MACS-Sortierung nach Anreicherung mit z.B. Percoll Gradient erhalten werden; ferner können in vivo und in vitro die transgenen Zellen mittels anti-CD8 (anti-CD4) fluoreszent konjugierten Zell-Oberflächenantikörpern leicht identifiziert werden. Gleichzeitig kann auch die höchstmögliche quantitative Anreicherung des gewünschten Zelltyps erreicht werden. Eine zufällige Zugabe des Se-

lektionsmediums, unabhängig von der Information über die Zelldifferenzierung, würde zu einer vorzeitigen Zerstörung der Vorläuferzellen oder nur zu einer geringen Anzahl terminal differenzierter Zellen führen.

5

3. Es ist davon auszugehen, dass die Differenzierung von ES-Zellen zu spezifischen Zelltypen, insbesondere in der natürlichen Umgebung des jeweiligen Organs, besonders effizient verläuft, da in der Organumgebung weitere Faktoren vorliegen, die die gewebespezifische Differenzierung der ES-Zellen vorantreiben. In der Tat konnten wir in unseren Transplantationsversuchen zeigen, dass ohne eine Gewebeschädigung (Abwesenheit von Differenzierungsfaktoren) kein Einwachsen und keine Differenzierung transplantierter embryonaler Herzmuskelzellen zu beobachten ist. Ferner kann nach der Transplantation in ein kryoinfarktiertes Areal eine deutlich gesteigerte Herzmuskelgeneration unter Verwendung undifferenzierter embryonaler Stammzellen beobachtet werden (in vitro nur 3-5%, in vivo wesentlich effektiver, aber mit einer Generation von Tumoren). Aufgrund der hohen Sensitivität von ES-Zellen ohne das Resistenzgen gegen Antibiotika kann das erfindungsgemäße Verfahren dazu benutzt werden, die erfindungsgemäß bereit gestellten transgenen ES-Zellen in das jeweilige Organ in vitro oder in vivo einzubringen, in welchem die hoch effiziente Differenzierung, beispielsweise zu Herzzellen, stattfindet. Nach mehreren Wochen wird dann das Selektionsmedium zugegeben, und alle von den ES-Zellen stammenden Zellen mit Ausnahme der das Resistenzgen tragenden werden systematisch abgetötet. Bei dieser Vorgehensweise ist eine effizientere Geweberegeneration ohne das damit verbundene Risiko einer Tumorentstehung zu erwarten. Entscheidend für das hier entwickelte System ist, daß das Antibiotikaresistenzgen und das Reportergen unter Kon-

trolle desselben Promotors stehen. Der Grund hierfür liegt darin, daß das Reportergen den Zeitpunkt des Beginns der zellspezifischen bzw. entwicklungsspezifischen Differenzierung, z.B. der Herzdifferenzierung anzeigt; z.B. ist ein Großteil der frühen Herzzellen bereits gebildet und noch proliferativ. Zu diesem Zeitpunkt wird nun auch das Antibiotikaresistenzgen gebildet und somit alle Zellen nach Zugabe des Antibiotikas abgetötet, abgesehen von den Zellen, die das Resistenzgen exprimieren, z.B. also den Kardiomyozyten. In der DE 19727962 wurden unterschiedliche Promotoren verwendet, so dass diese Synchronisation nicht gegeben und deshalb die Selektion ineffizient war.

Anstatt einer Doppeltransfektion könnte auch ein Vektor-konstrukt mit einer IRES gebaut werden, in der ein und derselbe Promotor, z.B. der  $\alpha$ -MHC Promotor, das Reportergen und das Antibiotikaresistenzgen treibt und somit eine einfache Transfektion genügt.

Ein wichtiges Ziel der Erfindung liegt natürlich nicht nur in der in vitro-, sondern insbesondere in der in vivo-Anwendbarkeit der durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen differenzierten Zellen, insbesondere von Herzzellen. Um auszuschließen, daß bei einer Transplantation beispielsweise pluripotente Stammzellen oder Keimbahnzellen, die sich zu Tumorzellen entwickeln könnten, in den Patienten gelangen, können in einer Ausführungsform der Erfindung die Zellen durch Überexpression, beispielsweise durch Verwendung eines Oct-4 Promotors, noch sensibler für das Resistenzgen gemacht werden. Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit, daß pluripotente Zellen den Angriff durch das Resistenzgen überleben, weiter verringert.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die Zellen zusätzlich so manipuliert werden, daß spezifische Gewebe nicht gebildet werden. Dies kann beispielsweise durch Einfügen von Repressorelementen, z.B. eines Doxizyklin-induzierbaren Repressorelements, erfolgen. Hierdurch könnte eine mögliche Kontamination der gewünschten differenzierten Zellen mit pluripotenten, potentiell tumorogenen Zellen ausgeschlossen werden.

10 In einer weiteren Ausführungsform kann durch die geeignete Wahl eines Promotors, beispielsweise des chicken  $\beta$ -Aktin-Promotors, auf Zellen mit einer hohen Teilungsrate selektiert werden und über diesen Weg die Möglichkeit eines Überlebens pluripotenter Zellen weiter verringert werden.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform wurden zwei Arten von Vektoren verwendet, um embryonale Stammzellen stabil zu transfizieren und um Herzzellen spezifisch aus einer differenzierenden Kultur von embryonalen Stammzellen zu selektieren:

20

1. das Herz- $\alpha$ -MHC-Promotor gesteuerte Resistenzgen für Puromycin ( $\alpha$ -MHC-Pur);
2. das Herz- $\alpha$ -MHC-Promotor gesteuerte Gen des verstärkten Grün Fluoreszierenden Proteins (enhanced Green Fluorescent Protein=EGFP) ( $\alpha$ -MHC-EGFP).

25

Das Neue der vorliegenden Erfindung besteht in der kombinierten Anwendung sowohl eines Resistenzgens (z.B. Pur) als auch z.B. eines live Fluoreszenz-Reportergens (z.B. EGFP) unter Kontrolle desselben, bevorzugt herzspezifischen Promotors (z.B.  $\alpha$ -MHC). Ein derartiger Ansatz zeigt eine Kombination der nachfolgenden Vorteile, die die genetische Selektion, z.B. der von ES abstammenden Herzmuskelzellen, erleichtern:

30

- i) Überwachen der Differenzierung von embryonalen Stammzellen, z.B. der Herzdifferenzierung von sehr frühen Entwicklungsstadien ab durch Nachweis einer spezifischen, z.B. herzspezifischen Fluoreszenz (Kolossoff et al., 1998).
- ii) Optimierung der Zeit für den Beginn einer Arzneistoff-Anwendung durch Definition der Fluoreszenz als Indikator einer z.B.  $\alpha$ -MHC-Promotor-Aktivität, die das Resistenzgen steuert.
- iii) Visuelle Kontrolle des Prozesses der Arzneistoff-Selektion durch live-Überwachung bzw. -Monitoring des Verhältnisses zwischen fluoreszenten und nicht fluoreszenten Zell-Fraktionen. Durchführbarkeit einer quantitativen Schätzung des Spiegels einer spezifischen Zelltyp-Anreicherung mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).
- iv) Die bevorzugte Verwendung des Pur-Gens unter Kontrolle eines bevorzugt herzspezifischen Promotors ermöglicht eine hocheffektive herzspezifische Selektion durch Puromycin sowohl in adhärenenten als auch in Suspensions-Kulturen differenzierender ES-Zellen, weil Puromycin eine schnellere und stärkere toxische Wirkung auf nicht resistente Zellen als andere bekannte Selektionsmittel, wie beispielsweise G418 und Hygromycin, aufweist.

Die vorliegende hocheffiziente und sehr schnelle Selektion mit Puromycin im Gegensatz zu anderen Antibiotikaresistenzgenen war überraschend. Ferner war es für ES Zellen eine völlig unbekannte Beobachtung.

- v) Die Möglichkeit der Überwachung des Schicksals eingefügter selektierter Zellen nach Transplantation durch bloße An-

wendung des z.B. EGFP-Fluoreszenznachweises. Dies ist von grundlegender Bedeutung zur Etablierung neuer Operationstechniken.

5 Die Erfindung beinhaltet mehrere Aspekte, die unter Berücksichtigung des Standes der Technik nicht mit einer vernünftigen Aussicht auf Erfolg zu erwarten waren.

10 1. Zuerst überraschte die Einfachheit, mit der die ES Zellen auch doppelt transfiziert werden konnten. Unsere Versuche zeigten, daß in den meisten transfizierten Klonen eine effektive Transfektion mit beiden Konstrukten stattgefunden hatte.

15 2. Ferner zeigte sich kritisch für die Effizienz der Antibiotikaresistenz, daß das Selektionsagens während der frühen Phase der Differenzierung, insbesondere der Differenzierung von Herzzellen, zugegeben wird. Hierdurch wird offensichtlich die Effizienz der z.B. Kardiomyogenese *in*  
20 *vitro* erhöht, höchstwahrscheinlich weil die umgebenden Zellen negative Signale freisetzen. Als frühe Phase sind besonders bei der hängenden Tropfenmethode mit Plattierung 2-4 Tage nach der Plattierung gemeint, einem Stadium in dem in Bezug auf Proliferation (Zellen sind noch proliferativ) sowie Ionenkanalexpression (If Kanal ist noch  
25 in allen Kardiomyozyten exprimiert, alle Zelltypen auch Ventrikelzellen exprimieren diesen Ionenkanal und schlagen spontan) und deren Regulation (basale Hemmung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Stroms mittels muskarinergen Agonisten über das Stickstoff-Monoxid System) noch frühe Muster vorzufinden  
30 sind.

3. Überraschend war auch die hocheffiziente Aktion von Puro-mycin, das innerhalb von 12-24 Stunden zu einer 99% Abtö-tung aller nicht-Kardiomyozyten im EB führt.

- 5 4. Ein entscheidender Vorteil der vorliegenden Erfindung ist die Möglichkeit einer Selektion auch an nicht plattierten EBs bzw. in den Rührkulturen, da hier die abgetöteten Zellen unproblematisch abgewaschen und somit erstmals reine zelltypspezifische Kulturen aus ES Zellen gewonnen  
10 werden können. Teilweise wird die Elimination der nicht vitalen Zellen durch enzymatische Verdauung (z.B. Trypsin, Kollagenase) verbessert. Die Effizienz dieser Methode konnte ferner dadurch bestätigt werden, daß Kar-diomyozyten in nicht plattierten EBs erneut als Zellver-  
15 band spontan zu kontrahieren beginnen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden die embryonalen Stammzellen stabil mit zwei Sätzen von Vektor-Selektionssystemen transfiziert. Der erste Vektor enthält die  
20 Information für ein erstes nicht zellschädigendes detektier-bares, z.B. fluoreszierendes Protein und/oder für ein erstes Resistenzgen, und beide Gene stehen unter Kontrolle eines ersten zellspezifischen oder entwicklungsspezifischen Promo-tors, der jeweils in funktioneller Weise mit den genannten  
25 Genen verbunden ist. Ein zweiter Vektor enthält die Informa-tion für ein zweites nicht zellschädigendes, detektierbares, z.B. fluoreszierendes Protein und/oder ein zweites Resistenz-gen, und beide Gene liegen unter Kontrolle eines zweiten zellspezifischen oder entwicklungsspezifischen Promotors, der  
30 wiederum in funktioneller Weise jeweils mit diesen Genen verknüpft ist. Alternativ zur Elektroporation kann ein hocheffi-ziente Transfektion auch mit Viren sowie mit Lipofektion vor-genommen werden.



Besonders erwähnenswert im Zusammenhang mit einer erfolgreichen Transplantation am Herzen ist die *in vitro* Selektion mesodermaler Vorläuferzellen. Diese Zellen werden entsprechend obigem Schema unter bevorzugt Brachyuria, Nkx2.5 und ANF Promotor-Schaltelementen exprimierten Fluoreszenz- und Resistenzgenen selektioniert und daraufhin transplantiert. Anstatt des Fluoreszenzgens sind natürlich auch Gene der oben beschriebenen anderen detektierbaren Proteine einsetzbar. Dieses Schema ist ideal dazu geeignet, große Menge von aufgereinigten Vorläuferzellen zu produzieren, die ohne Gefahr z.B. nach Implantation ins geschädigte Myokard unter nativen Differenzierungsfaktoren *in situ* zu Herzzellen differenzieren.

Ferner eignet sich dieser Ansatz in idealer Weise dazu, unterschiedliche Wirkstoffe/Differenzierungsfaktoren *in vitro* auszutesten, die mesodermale Vorläuferzellen in die unterschiedlichen spezialisierten Zelltypen (u.a. immunologische Zellen, glatte- und Skelettmuskelzellen sowie Endothelzellen) differenzieren. Somit eignet sich dieses System ideal zur Testung von Differenzierungsfaktoren, pharmakologischen und unterschiedlichen Wirkstoffen (u.a. toxikologischen Substanzen, Umweltgiften, Gebrauchskemikalien, zum Test auf teratogene/embryotoxikologische Effekte und zur Wirkstoffkunde).

Ferner wurde neben der *in vitro* Differenzierung und Selektion ein völlig neues Schema zur Gewebewiederherstellung etabliert. Hierbei wird einerseits der Vorteil ausgenutzt, daß im geschädigten Gewebe (z.B. im Herzinfarktareal) native Faktoren freigesetzt werden, die die Herzzelldifferenzierung positiv beeinflussen. Deshalb werden z.B. transgene embryonale Stammzellen generiert, in denen einerseits z.B. insbesondere das Puromycin-Resistenzgen unter Kontrolle z.B. des  $\alpha$ -MHC Promotors steht ( $\alpha$ -MHC-Puromycin). Um die Möglichkeit der Tumorentstehung auszuschließen, wird zusätzlich das Poxvirus

getriebene tk-Element verwendet. Deshalb werden die embryonalen Stammzellen mit einem ubiquitär exprimierten Promotor (z.B. chicken  $\beta$  actin Promotor) und dem anti-tk Element unter Kontrolle des  $\alpha$ -MHC Promotors triple transfiziert. Daraufhin werden diese transgenen, undifferenzierten ES Zellen in das geschädigte Herzareal gespritzt. Die intrinsischen Faktoren begünstigen eine hocheffiziente Herzentwicklung der ES Zellen *in vivo* im Gegensatz zu der *in vitro* Differenzierungskapazität. Nach 14-21 Tagen werden selektiv alle nicht-Kardiomyozyten mittels der kombinierten systemischen Gabe des Resistenzagens, z.B. Puromycin und des Virostatikums Gancyclovir, selektioniert. Durch diese kombinierte Selektion wird das potentielle Überleben undifferenzierter ES Zellen und die Gefahr der Tumorgenität vermieden. Ferner wird ein wesentlich effizienterer Herzmuskelaufbau erzielt.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen und der beiliegenden Figuren näher erläutert. Die Figuren zeigen:

20

Fig. 1: Kombinierte Transmission/Fluoreszenz-Lichtmikroskopie-Bilder von ausplattierten EBs, die von  $\alpha$ MHC-Pur transgenen ES-Zellen abstammten, am 10. (A), 11. (B), 12. (C) und 14. (D) Tag der Entwicklung nach 1, 2, 3 beziehungsweise 5 Tagen der Puromycin-Behandlung.

25

Fig. 2: Kombinierte Transmission/Fluoreszenz-Lichtmikroskopie-Bilder einer Suspensionskultur von  $\alpha$ MHC-EGFP/ $\alpha$ MHC-Pur EBs am 19. Tag der Entwicklung nach 10 Tagen Puromycin-Behandlung.

30

Fig. 3: (A) FACS-Profil der dissoziierten, 16 Tage alten EBs, die von  $\alpha$ MHC-EGFP transgenen ES-Zellen abstammten. Alle EBs enthielten große schlagende und fluoreszierende Herz-

muskelzell-Cluster. EGFP positive Zellen (M1) bilden weniger als 1% der Gesamtzellpopulation.

(B) FACS-Profil der dissoziierten 22 Tage alten EBs, die von  
5 kotransfizierten p $\alpha$ MHC-EGFP und p $\alpha$ MHC-Pur ES-Zellen abstamm-  
ten, nach 13 Tagen Puromycin-Behandlung. EGFP positive Zellen  
(m1) bilden 42 - 45% der Gesamtzellpopulation.

Fig. 4: Protokoll zur Gewinnung von embryoiden Körperchen

10

### Beispiel 1

#### **MATERIALIEN UND METHODEN.**

15

#### Vektoren.

Der ein regulatorisches 5,5 kb Fragment des Maus  $\alpha$ -MHC-Gens  
enthaltende Vektor wurde von Dr. J. Robbins (Children Hospi-  
20 tal Medical Center, Cincinnati, USA) bereitgestellt (Gulick  
et al., 1991).

Das Fragment wurde aus dem Vektor mit BamHI und SalI ausge-  
schnitten, mit Blunt-Ends versehen und in die SmaI-Stelle der  
25 multiplen Klonierungsstelle des pEGFP-1 Vektors kloniert  
(enthält die kodierende Sequenz für EGFP, die verstärkte Ver-  
sion von GFP und die Neo-Kassette für die G418-Resistenz)  
(KLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, USA). Die richtige  
"Schwanz-an Kopf" (tail-to-head) -Orientierung des Promotors  
30 zur kodierenden Sequenz von EGFP im sich ergebenden Vektor  
wurde überprüft und durch EcoRI-Restriktion bestätigt.

Der kodierende Teil des Pur-Gens (HindIII-SalI-Fragment) wur-  
de in p $\alpha$ MHC-EGFP anstatt der durch BamHI-AflIII ausgeschnit-

tenen EGFP-kodierenden Sequenz blunt-ligiert (Ligation stumpfer Enden). Die richtige Ausrichtung beziehungsweise Orientierung im sich ergebenden Vektor p $\alpha$ -MHC-Pur wurde durch SmaI und ClaI-StuI-Restriktionen bestätigt.

5

#### Zellkultur, Transfektions- und Selektions-Verfahren.

Alle Stadien der Vermehrung und der Selektion von ES-Zellklonen wurden in ES-Zell-Vermehrungsmedium durchgeführt das aus folgendem bestand: Glucosereiches DMEM Medium ergänzt mit:

nicht essentiellen Aminosäuren (0,1 mM), L-Glutamin (2mM), Penicillin und Streptomycin (jeweils 50 $\mu$ g/ml),  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,1 mM), LIF (ESGRO<sup>TM</sup>) (500u/ml), fötales Kälberserum (FCS) (15% V/V).

Beide Vektoren, p $\alpha$ MHC-EGFP und p $\alpha$ MHC-Pur, wurden durch HindIII-Restriktase vor Cotransfektion durch Elektroporation der ES-Zellen (D3 Linie) linearisiert. Elektroporationsbedingungen:

Zellen: 4 bis 5 x 10<sup>6</sup> in 0,8 ml PBS (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> frei)

Vektor-DNA: 20-40 $\mu$ g;

Elektroporations-Küvette: 0,4cm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA);

Elektroporationsgerät: Gene Pulser<sup>TM</sup> (Bio-Rad Laboratories);

Elektrische Impulsbedingungen: 240V, 500 $\mu$ F.

Nach dem elektrischen Impuls wurde die Zellsuspension 20 Minuten lang in Eis gekühlt und dann mit einem G418-resistenten Fibroblasten-Feeder Layer in 10 ml ES-Zellvermehrungs-Medium auf die 10 cm Gewebs-Qualität Petrischale übertragen. 2 Tage später wurde Geneticin G418 (GibcoBRL), 300  $\mu$ g/ml zur Selektion von G418-resistenten Zellen zugesetzt. Das Medium mit G418 (300  $\mu$ g/ml) wurde jeden zweiten Tag ausgetauscht. Nach 8

- 10 Tagen Selektion erschienen die Arzneistoff-resistenten Kolonien. Die Kolonien wurden herausgenommen, getrennt in 0,1% Trypsin/EDTA-Lösung trypsiniert und auf 48 Well-Platten mit G418 resistenter Fibroblasten-Feeder Layer in ES-Zellvermehrungs-Medium und G 418 (300µg/ml) ausplattiert. Nach 2 - 4 Tagen Wachstum wurden ES-Zellklone nachfolgend trypsinisiert und auf 24 Well-Platten und darauf auf 5 cm Gewebs-Petrischalen vermehrt. G418 (300 µg/ml) und G418 resistente Fibroblasten-Feeder Layer lagen in allen Stadien der ES-Zellklon-Vermehrung vor.

#### Differenzierung von ES-Zellen und herzspezifische Selektion.

15

Alle Schritte der Differenzierungsvorschrift wurden im "Differenzierungsmedium" durchgeführt, das aus allen Bestandteilen des vorstehend erwähnten "ES-Zell-Vermehrungsmediums", ausschließlich LIF, bestand und bei dem 15% FCS durch 20% FCS ersetzt waren. Nach der Vermehrung wurden die ausgewählten G418 resistenten ES-Klone trypsinisiert und in "Differenzierungsmedium" zu einer Endkonzentration von 0,020 bis 0,025 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml resuspendiert. Anschließend wurden "hängende Tropfen" durch Anordnen von 20µl dieser Suspension (400 bis 500 Zellen) an den Deckeln von Bakterienpetrischalen (Greiner Labortechnik, Deutschland) gebildet. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bildeten die ES-Zellen die Aggregate oder "embryoiden Körper", die in die bakteriellen Petrischalen mit "Differenzierungsmedium" ausgewaschen und für zusätzliche 5 Tage inkubiert wurden. Darauf wurden die embryoiden Körperchen getrennt auf mit Gelatine vorbehandelten 24 Well Gewebs-Qualitäts-Platten in "Differenzierungsmedium" plattiert. In parallelen Experimenten wurde eine Anzahl von embryoiden Kör-

perchen in Suspension gelassen, wo sie ebenfalls wie die plattierten behandelt wurden.

5 In allen Wachstums-, Differenzierungs- und Arzneistoff- Selektions-Stadien wurden EBs unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines FITC Filtersets (Zeiss, Jena, Deutschland) überwacht.

10 Bei typischen Experimenten wurde die Anwendung des selektiven Arzneistoffes Puromycin (1 - 2 µg/ml) am Tag 9 - 10 der Entwicklung begonnen, wenn die erste EGFP-Fluoreszenz überwacht wurde. Das Medium mit der Wirksubstanz wurde alle 2 - 3 Tage ausgetauscht.

#### 15 FACS-Analyse

Für eine FACS-Analyse wurden 10 bis 20 embryoide Körperchen aus unterschiedlichen Entwicklungs- und Selektionsstadien mit PBS gewaschen und dann durch Trypsin-Behandlung für 2-3 Minuten (120µl Trypsin/EDTA-Lösung) zu einer einzigen Zellsuspension dissoziiert. Daraufhin wurden 1 ml DMEM + 20% FCS der  
20 einzigen Zellsuspension zugesetzt. Nach Zentrifugierung (1000 UpM) für 5 Minuten wurden die Zellen in 0,5 - 1,0 ml PBS, das  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM) und  $\text{Mg}^{2+}$  (0,5 mM) enthielt, resuspendiert.

25

Die GFP Expression durch von embryonalen Stammzellen abstammende Zellen unterschiedlichen Alters wurde auf einem FACSCalibur<sup>TM</sup> Durchflußzytometer (Becton Dickinson, BRD) untersucht, das mit einem 488 nm Argonionen-Laser (15 mW) ausgestattet  
30 war. Die Zellen wurden zu einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in PBS (pH 7,0, 0,1% BSA) resuspendiert und dann auf dem FACSCalibur<sup>TM</sup> mit einem Minimum von 10.000 lebensfähigen Zellen untersucht, die für jede Probe gewonnen wurden. Die emittierte Fluoreszenz von GFP wurde bei 530 nm (FITC-

Bandfilter) gemessen. Das *live* Gating wurde durch Zusatz von Propidiumiodid (2µg/ml) zu den Proben unmittelbar vor der Messung durchgeführt. Nekrotische Zellen mit einer positiven Propidiumiodid (PI) Färbung (585 nm Bandfilter) zeigten höhere Seiten-Streuungs(SSC)-Signale im Vergleich zu den lebensfähigen PI-negativen Zellen. Nicht lebensfähige Zellen wurden aus der nachfolgenden Untersuchung ausgeschlossen, indem Zellen mit niedrigen SSC-Signalen durchgelassen wurden. Nicht transfizierte ES-Zellen der Zelllinie D3 wurden für Negativkontrollen verwendet. Untersuchungen wurden unter Verwendung der CellQuest® Software (Becton Dickinson) durchgeführt.

### ERGEBNISSE

- ES-Zellen, die sowohl bezüglich  $\alpha$ MHC-EGFP als auch  $\alpha$ MHC-Pur-Vektoren transgen waren, wurden vermehrt und in der Herz-Differenzierungs-Vorschrift verwendet. Alle getesteten Klone zeigten im ES-Zellstadium und nach Bildung von EBs bis zum Tag des Plattierens (7 Tage nach der Bildung von "hängenden" Tropfen) keine mikroskopisch nachgewiesene EGFP-Fluoreszenz. Am ersten bis zweiten Tag nach dem Ausplattieren (8 - 9 Tage alte EBs) erschienen die ersten EGFP-fluoreszierenden Gebiete, die üblicherweise einen Tag später spontan zu schlagen begannen. Bemerkenswerterweise zeigte die überwiegende Mehrheit von EB-Zellen außerhalb der schlagenden Cluster kein mikroskopisch nachweisbares Fluoreszenzniveau, was eine hohe Gewebsspezifität der EGFP-Expression während der ES-Zellkardiomyogenese zeigt.
- Nach Anwendung von Puromycin (typischerweise beginnend am Tag 9 - 10 der Entwicklung) wurden die ersten signifikanten Veränderungen in der Morphologie der ausplattierten EBs bereits innerhalb von 12 Stunden (mittels Langzeitbeobachtungssystem) am nächsten Tag nachgewiesen: Der Zellauswuchs, der die

schlagenden Cluster der EGFP-fluoreszierenden Zellen umgab, hatte dramatisch abgenommen und die Schlagintensitäten der vom umgebenden Auswuchs befreiten Cluster hatte sich in unerwarteter Weise intensiviert (Fig. 1A). Während der nächsten  
5 wenigen Tage schritten diese Veränderungen fort und zeigten sowohl ernsthafte Zerstörung nicht fluoreszierender Zellmassen als auch eine Kompaktierung fluoreszierender Herz-Cluster mit intensiven kontraktile Aktivitäten (Fig. 1B,C). Bereits am Tag 1 der Puromycin-Behandlung hatten sich einige der embryoiden Körperchen visuell der sie umgebenden nicht fluores-  
10 zierenden Zellen entledigt und sahen wie isolierte, schlagende und fluoreszierende Cluster aus (Fig. 1D). Sogar nach 4 Wochen der Entwicklung und nach 18 Tagen der Puromycin-Behandlung zeigten derartige isolierte Cluster noch eine intensive kontraktile Aktivität, wohingegen bei ihren unbehan-  
15 delten Gegenstücken typischerweise eine derartige Aktivität am 17.-20. Tag der Entwicklung zum Stillstand kam.

Sowohl die erhöhte EGFP-Fluoreszenz als auch die lang anhaltende kontraktile Aktivität wurden bei Puromycin-behandelten  
20 embryoiden Körperchen in Suspensions-Kultur im Vergleich mit unbehandelten Gegenstücken überwacht. Nach mehr als drei Wochen der Entwicklung und zwei Wochen der Puromycin-Behandlung waren Suspensionen von embryoiden Körperchen reichlich mit  
25 intensiv fluoreszierenden und kontraktile embryoiden Körperchen versehen, von denen einige sichtbar als insgesamt schlagende fluoreszierende Cluster vorlagen (Fig. 2). Diese Befunde belegen eindeutig, daß Kardiomyozyten ohne die umgebenden Zellen weiter differenzieren und am Leben gehalten  
30 werden können. Ferner zeigt das spontane Schlagen die funktionelle Integrität der selektionierten Herzmuskelzellen auf. Von entscheidendem Vorteil war jedoch auch die Schnelligkeit der Puromycin Selektion, die innerhalb von 12-24 Stunden nach



Applikation zu einer 99% Vernichtung aller nicht-Kardiomyozyten führt.

Die FACS-Analyse bewies eine hohe Effektivität der Puromycin-Selektion der verwendeten transgenen ES-Zellen. Während die EGFP-fluoreszierenden Zellen nur ungefähr 1% Anteil der Gesamtzellpopulation unbehandelter Zellen darstellten, die einen p $\alpha$ MHC-EGFP-Vektor besaßen, führte die Puromycin-Behandlung von differenzierenden embryonale Stammzellen, die sowohl bezüglich p $\alpha$ MHC-EGFP als auch p $\alpha$ MHC-Pur Vektoren transgen waren, zu einer 42 - 45%igen Anreicherung der Zellpopulation durch EGFP-fluoreszierende Zellen (Fig. 3). Die einfache Berechnung zeigt, daß bereits 97 - 99% der gesamten nicht kardiogenen Zellpopulation effektiv im Verlauf der Puromycin-Behandlung der Suspensionskultur von transgenen ES-Zellen getötet wurden. Die noch existierende Fraktion an Puromycin-resistenten nicht- oder -schwach fluoreszierenden Zellen (Fig. 3) konnte durch eine nicht-spezifische Aktivität des  $\alpha$ MHC-Promotors in einigen der nicht kardiogenen Zellen erklärt werden. Eine derartige Fraktion konnte weiter entweder durch Höchstkonzentrationen von Puromycin oder durch FACS-Sortierverfahren eliminiert werden.

## 25 Beispiel 2

Als Ausgangsvektor wurde pIRES2-EGFP (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) eingesetzt. Dieser Vektor enthält die interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) des Encephalo-Myocarditis-Virus zwischen der multiplen Klonierungsstelle (MCS) und dem EGFP-Gen. Dies ermöglicht, daß sowohl die Puromycinresistenz- als auch die EGFP-Gene getrennt von einer einzigen bicistronischen mRNA translatiert werden.

Der pIRES2-EGFP-Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen AseI und Eco47III an den Enden stumpf gemacht und religiert, um den Cytomegalo-Virus immediate early (CMV-IE)-Promotor zu deletieren. Der so erhaltene Vektor wurde mit SmaI verdaut und  
5 mit der  $\alpha$ -MHC-PurR-Kassette ligiert, die durch SacI und ClaI aus dem oben beschriebenen  $\alpha$ -MHC-PurR-Vektor herausgeschnitten worden war. Durch Verdauen mit SacI/SmaI wurde die richtige Orientierung des so erhaltenen p $\alpha$ -MHC-IHRES-EGFP (p $\alpha$ -PIG)-Vektors sichergestellt.

10

ES-Zellen (D3-Zelllinie) wurden mit p $\alpha$ -PIG transfiziert; die nachfolgende G418-Selektion, die Vermehrung und die Differenzierung der so erhaltenen stabilen Klone wurde, wie bereits im Beispiel 1 beschrieben, durchgeführt.

15

Nach Durchführung des Standard-Differenzierungsprotokolls konnte man schlagende Cluster EGFP-positiver Herzzellen zwischen dem achten und neunten Tag der Entwicklung nachweisen, worauf Puromycin 5 $\mu$ g/ml zugegeben wurde. Nach den ersten drei  
20 bis vier Tagen der Puromycinbehandlung enthielten die embryoiden Körperchen (EBs) hauptsächlich EGFP-positive, intensiv schlagende Cluster an Herzzellen; nicht-Herzzellen lösten sich ab und wurden während des Mediumwechsels eliminiert. Das gleiche Ergebnis konnte auch dadurch erzielt werden, daß man  
25 die EBs vollständig in Suspensionskultur wachsen ließ und dort die Resistenzbehandlung mit dem Antibiotikum durchführte. Eine FACS-Analyse zeigte eine Anreicherung von zumindest 70% (Durchflußzytometrie unter Verwendung von EGFP als read out) in der so erhaltenen Zellkultur. Die Anordnung des Re-  
30 portergens und des Resistenzgens auf einem Vektor unter Kontrolle eines Promotors, bevorzugt in Verbindung mit einer IRES, eignet sich somit hervorragend zur Herstellung differenzierter embryonaler Stammzellen, die so weitgehend wie möglich frei sind von undifferenzierten Stammzellen. Das gleiche

gilt natürlich für Keimbahnzellen bzw. adulte Stammzellen und nicht nur für embryonale Stammzellen. Insbesondere konnte durch dieses Beispiel gezeigt werden, daß eine außerordentlich hohe Gewebespezifität für sich aus ES-Zellen entwickeln-  
5 de Herzzellen erreichbar ist.

#### Gültigkeit des Puromycin-Selektionsprotokolls

10 Das Puromycin-Selektionsverfahren wurde anschließend in einem autologen Maus-Modell, in welchem eine Verletzung des Herzens simuliert wurde, getestet und konnte so validiert werden. Zu diesem Zwecke wurde ein Maus-Transplantations-Modell eingesetzt, in welchem embryonale Stammzellen oder durch in vitro-  
15 Differenzierung von ES-Zellen erhaltene Herzzellen (10.000 - 100.000 Zellen) in einen Empfänger injiziert wurden, dessen Herz durch eine Kältebehandlung teilgeschädigt war. Die Entstehung von Tumoren wurde anhand der gesamten Maus, dem isolierten Herzen und auch an Gewebeschnitten morphologisch untersucht;  
20 diese Untersuchungen wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Operation im Zeitraum von zwei Tagen bis zwei Monaten durchgeführt. Diese Vorgehensweise ermöglichte eine genaue Bewertung des Tumorpotentials der verschiedenen Zellpräparationen. Bei Injektion nicht-differenzierter ES-Zellen in  
25 die Kryo-Verletzung (100.000 Zellen) entstanden große Tumoren in den Mäusen. 10 Tage nach der Operation erlagen die Tiere diesen Tumoren. Es entstanden aber auch dann Tumoren, wenn ES-Zellen in vitro zu Herzzellen differenzierten und die schlagenden Bereiche, die für von ES-Zellen abstammenden Kardiomyozyten typisch sind, abgetrennt, isoliert und 10.000 bis  
30 50.000 Zellen hiervon in die Mäuse injiziert wurden. Dies beweist das hohe Tumorpotential embryonaler Stammzellen im Herzen und die hohen Anforderungen, die an ein hochspezifisches Selektionsverfahren zu stellen sind.

In einem nächsten Versuch wurden transgene ES-Zellen, die mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt stabil transfiziert waren (Reportergen und Resistenzgen unter Kontrolle eines Promotors auf einem Vektor), nach dem Nachweis der EGFP-Expression für fünf bis sieben Tage einer Puromycinbehandlung unterzogen. In einer groß angelegten Versuchsreihe von mehr als 25 operierten Mäusen, die alle am Herzen der oben beschriebenen Kryo-Behandlung unterzogen worden waren, konnte selbst nach mehreren Monaten keine Bildung von Tumoren beobachtet werden, wenn diese von puromycinresistenten ES-Zellen abstammenden Zellen (10.000 - 50.000 Zellen) in die verletzten Maus-Herzareale injiziert wurden (Doppeltransfektions-Konstrukte). Tatsächlich gelang es, die Zellen nach der Transplantation zu identifizieren, und es konnte deutlich gezeigt werden, daß die Zellen erfolgreich transplantiert werden konnten und sich zu terminal differenzierten Kardiomyozyten weiter differenzierten. Diese Versuche beweisen damit eindeutig die Fähigkeit der erfindungsgemäß beschriebenen Technik, von ES-Zellen abstammende, in vitro-differenzierte Zellen effizient anzureichern und eine Population zu erhalten, in der sich keine undifferenzierten ES-Zellen mehr befinden. Diese Effizienz ist unter Berücksichtigung der hier gezeigten hohen Tumorigenität von von ES-Zellen abstammenden Zellen im Herzen besonders bemerkenswert.

#### SCHLUßFOLGERUNGEN

1. Stabile transgene embryonalen Stammzell-Klone, die mit den Expressions-Vektoren p $\alpha$ MHC-EGFP und p $\alpha$ MHC-Pur kotransfiziert waren, wurden gebildet.

2. Eine Puromycin-Behandlung der transgenen embryonalen Stammzellen im Verlaufe der Differenzierung *in vitro* zeigte eine hohe Effizienz der kardiospezifischen Selektion im Vergleich mit einer Hygromycin-Behandlung von früher erzeugten  $\alpha$ MHC-Hyg ES-Zelllinien (Daten nicht angegeben).

3. Die selektierten differenzierten Zellen zeigten einen höheren Grad an morphologischer und funktioneller Lebensfähigkeit und Langlebigkeit als ihre unbehandelten Gegenstücke, was nahelegt, daß der genetische Selektions-Ansatz differenzierende embryonale Stammzellen effektiv von negativen Einflüssen der sie umgebenden Zellen befreit.

4. Die kombinierte Anwendung von *live*-Fluoreszenz-Reporter- und Arzneistoff-Resistenzgenen unter einem gemeinsamen Zelltyp-spezifischen Promotor haben die gestraffte Überwachung und Quantifizierung eines Gesamtprozesses ermöglicht, einschließlich der Differenzierung und der Zelltyp-spezifischen Selektion. Die sich ergebenden Zellen sind für weitere Transplantations-Experimente einsetzbar, was das Überwachen eingefügter Zellen ermöglicht.

4. Der dargelegte Ansatz kann auf irgendeine Zelltyp-spezifische Selektion in einem ES-Zell-Differenzierungssystem angewendet werden, wenn ein hochspezifischer Promotor für einen entsprechenden Zelltyp oder ein spezifisches Entwicklungsstadium identifiziert und kloniert ist. Prinzipiell erlaubt das System die kombinierte Verwendung zweier unterschiedlicher Promotoren mit entsprechenden zweifarbigen *in vivo* fluoreszierenden Proteinen, beispielsweise den Gelb (EYFP) und Cyan (blau) (ECFP) Versionen von EGFP, und zwei Wirkstoff-Resistenzgenen. Ein derartiger Ansatz kann die Selektivität und Effizienz des Gesamtverfahrens weiter erhöhen.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten embryonalen Stammzellen, bevorzugt embryoide Körperchen, können zu toxikologischen Untersuchungen von Substanzen, beispielsweise Schwermetallen und Pharmaka, eingesetzt werden (siehe auch Auflistung weiter oben). Zu diesem Zweck werden embryonale Stammzellkulturen unter Verwendung des doppelten Vektorkonstrukts verwendet und das Selektionsagens nach Beginn der zelltypischen Differenzierung (Detektion der Fluoreszenz) hinzugegeben. Nach der Zellaufreinigung oder aber bereits während der ES-Zellkultivierung werden die unterschiedlichen zu testenden Substanzen zur Zellkultur hinzugegeben und zu verschiedenen Zeiten die fluoreszierenden Einzelzellen bzw. die Gesamtfluoreszenz mit unterschiedlichen Auslesemethoden (z.B. Durchflussszytometrie, Fluoreszenzreadern) im Vergleich zu den Kontrollen gemessen.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten embryonalen Stammzellen können zur Erzeugung transgener nicht menschlicher Säuger mit zellspezifischer oder entwicklungsspezifischer Expression des fluoreszierenden Proteins eingesetzt werden. Hierbei werden die beschriebenen ES-Zellen der Erfindung in Blastozysten von nicht menschlichen Säugern eingebracht. In einem nächsten Schritt werden die Blastozysten als Chimären, die durch Kreuzung homozygot werden, in Leihmütter übertragen und so transgene nicht menschliche Säuger erhalten.

In einer weiteren Ausgestaltungsform der Erfindung werden die transgenen embryonalen Stammzellen in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung zu Transplantationszwecken eingesetzt. Zu diesem Zweck werden hochaufgereinigte embryonale Stammzell-abgeleitete Kulturen benötigt, da bekannt ist, daß eine Kontamination mit undifferenzierten proliferierenden Stammzellen zur Tumorbildung führt. Dementsprechend eignet sich das hier beschriebene Verfahren ideal, hochaufgereinigte ES

Zell-abgeleitete zellspezifische Kulturen zu erhalten, die sich ideal zur Transplantation eignen (Klug et al., 1996).

Es sei abschließend noch einmal betont, daß die vorstehend an  
5 Hand embryonaler Stammzellen dargestellte Erfindung auch auf  
embryonale Keimbahnzellen, und auf adulte Stammzellen über-  
tragbar ist.

Die vorliegende Erfindung offenbart ein System zur zell- und  
10 entwicklungs-spezifischen Selektion von differenzierenden  
embryonalen oder adulter Stammzellen oder embryonaler Keim-  
bahnzellen durch kombinierte Anwendung von Resistenz- und de-  
tektierbaren Reportergenen unter gemeinsamer Kontrolle eines  
zell- und/oder entwicklungs-spezifischen Promotors.

**Literatur**

Anderson, D.J., Gage, F.H., and Weissmann, I.L. (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? Nat. Med. 7, 393-395.

5

Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J. Embryol. Exp. Morphol. 87, 27-45.

10

Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. Science 287, 1433-1438.

15

Heim, R. and Tsien, R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. Curr. Biol. 6, 178-182.

20

Kallmeier, R.C., Somasundaram, C., and Babi, P. (1995). A novel smooth muscle-specific enhancer regulates transcription of the smooth muscle myosin heavy chain gene in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 270, 30949-30957.

Klug, M.G., Soonpaa, M.H., Koh, G.Y., and Field, L.J. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. J Clin. Invest. 98, 216-224.

25

Kolossov, E., Fleischmann, B.K., Liu, Q., Bloch, W., Viatchenko-Karpinski, S., Manzke, O., Ji, G.J., Bohlen, H., Addicks, K., and Hescheler, J. (1998). Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific



expression of the green fluorescent protein. J Cell Biol 143, 2045-2056.

Lints, T.J., Parsons, L.M., Hartley, L., Lyons, I., and Harvey, R.P. (1993). Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants [published erratum appears in Development 1993 Nov;119(3):969]. Development 119, 419-431.

Lothian, C. and Lendahl, U. (1997). An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. Eur J Neurosci. 9, 452-462.

Muldoon, R.R., Levy, J.P., Kain, S.R., Kitts, P.A., and Link, C.J., Jr. (1997). Tracking and quantitation of retroviral-mediated transfer using a completely humanized, red-shifted green fluorescent protein gene. Biotechniques 22, 162-167.

Muller M, Fleischmann B.K., Selbert S, Ji G.J., Endl E, Mideler G, Mueller OJ, Schlenke P, Frese S, Wobus AM, Hescheler J, Katus, H. A., and Franz, W. M. Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells *in vitro*. FASEB J . 2000. Ref Type: In Press

O'Brien, T.X., Lee, K.J., and Chien, K.R. (1993). Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 5157-5161.

Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 276, 71-74.

Sartorelli, V., Webster, K.A., and Kedes, L. (1990). Muscle-specific expression of the cardiac alpha-actin gene requires MyoD1, CArG-box binding factor, and Sp1. *Genes Dev.* 4, 1811-1822.

- 5 Shambloott MJ, Axelmann J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, and Gearhart JD (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13726-13731.
- 10 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, and Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- 15 Wartenberg, M., Donmez, F., Ling, F.C., Acker, H., Hescheler, J., and Sauer, H. (2001). Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *FASEB J* 2001. Apr;15. (6. ):995. -1005. 15, 995-1005.
- 20 Wobus, A.M., Wallukat, G., and Hescheler, J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differentiation*. 48, 173-182.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Embryonale Stammzellen, embryonale Keimbahnzellen  
5 und/oder adulte Stammzellen, enthaltend DNA-Sequenzen mit der Information für zumindest ein Reportergen und zumindest ein Resistenzgen, wobei die DNA-Sequenzen beide unter der Kontrolle desselben Promotors stehen, der aus zumindest einem zell-spezifischen und/oder entwicklungs-spezifischen Promotor ausgewählt ist und operabel mit den  
10 Genen verbunden ist, und wobei die DNA-Sequenzen auf zumindest einem oder zwei Vektor-Konstrukten vorliegen.
2. Zellen nach Anspruch 1, wobei die Zellen Säugetierzellen  
15 sind und/oder das Reportergen für ein nicht zellschädigendes detektierbares Protein oder ein detektierbares Epitop kodiert.
3. Zellen nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Säugetierzellen  
20 von Primaten oder Nagetieren, insbesondere von Mäusen, Ratten oder Kaninchen, stammen, oder menschlichen Ursprungs sind.
4. Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, bei denen das detektierbare Protein ein nicht  
25 zellschädigendes fluoreszierendes Protein ist, bevorzugt ausgewählt aus (enhanced) Grün Fluoreszierendem Protein (EGFP und GFP), Rot Fluoreszierendem Protein (RFP), Blau Fluoreszierendem Protein (BFP), Gelb Fluoreszierendem Protein (YFP) und Cyan Fluoreszierendem Protein (CFP),  
30 insbesondere GFP, oder das Epitop ein Oberflächenepitop ist.

5. Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, bei denen das Resistenzgen die Resistenz gegen ein Nukleosid-Antibiotikum oder ein Aminoglykosid-Antibiotikum vermittelt.
- 5
6. Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, bei denen das Resistenzgen für eine Methotrexat-Resistenz oder eine Resistenz gegen Puromycin, Streptomycin, Neomycin, Gentamycin oder Hygromycin oder eine Resistenz gegen Vinblastin, Doxorubicin, und Actinomycin D, bevorzugt eine Multidrogen-Resistenz, verantwortlich ist.
- 10
7. Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Promotor ein Promotor ist, der für mesodermale Zellen, insbesondere Herzzellen, Neuronen, 15  
Glia-Zellen, hämatopoetische Zellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, für ektodermale Zellen, insbesondere Neurone, oder für endodermale Zellen, insbesondere Epithelzellen, spezifisch ist, insbesondere ein Promotor, 20  
der für Herzzellen spezifisch ist oder ein Promotor, der für Skelettmuskelzellen, Knorpelzellen oder Fibroblastenzellen spezifisch ist.
8. Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, bei denen der herzspezifische Promotor aus Nkx- 25  
2.5-, menschlichem  $\alpha$ -Aktin-,  $\alpha$ -MHC-,  $\beta$ -MHC und MLC-2V-Promotoren ausgewählt ist.
9. Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, bei denen der Promotor mit weiteren funktionellen DNA-Sequenzen, insbesondere Enhancer-Sequenzen oder 30  
Repressor-Sequenzen oder IRES-Sequenzen, verbunden ist.

10. Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, bei denen der zellspezifische Promotor ein herzspezifischer Promotor ist, der mit einem Puromycin-Resistenzgen operabel verbunden ist.

5

11. Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei

(a) die Zellen stabil zwei Vektoren enthalten, von denen der erste Vektor DNA-Sequenzen enthält, die für zumindest ein Reportergen kodieren, und der zweite Vektor DNA-Sequenzen enthält, die für zumindest ein Resistenzgen kodieren, wobei die DNA-Sequenzen beide unter der Kontrolle desselben Promotors stehen;  
oder

15

(b) die Zellen einen Vektor enthalten, der DNA-Sequenzen enthält, die für zumindest ein Reportergen und zumindest ein Resistenzgen kodieren, die beide auf ein- und demselben Vektor liegen und unter Kontrolle ein und desselben Promotors stehen, wobei bevorzugt eine IRES-Sequenz, bevorzugt zwischen dem Reportergen und dem Resistenzgen, angeordnet ist, oder

20

(c) die Zelle zwei Sätze selektiver Vektor-Systeme enthält, umfassend

25

- einen ersten Vektor mit DNA-Sequenzen, die für ein Reportergen und ein erstes Resistenzgen kodieren, die beide unter der Kontrolle eines ersten zell- und/oder entwicklungs-spezifischen Promotors stehen, der operabel mit diesen Sequenzen verbunden ist;

30

- einen zweiten Vektor, der DNA-Sequenzen umfaßt, die für ein zweites Reportergen und ein zweites Resistenzgen kodieren, die beide unter Kontrolle ei-

nes zweiten zell- und/oder entwicklungsspezifischen Promotors stehen, der operabel mit diesen Sequenzen verbunden ist.

- 5 12. Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, die ein weiteres Resistenzgen zur Selektion auf die mit den Vektor-Konstrukten stabil transfizierten Zellen enthalten, welches verschieden ist von dem ersten und zweiten Resistenzgen.

10

13. Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, die als Zellaggregate, insbesondere in Form von embryoiden Körperchen, vorliegen.

- 15 14. Sich differenzierende oder differenzierte Zellen, die durch die Verwendung eines zell -und/oder entwicklungs-spezifischen Promotors, insbesondere eines für die mesodermale, ektodermale und endodermale Differenzierung spezifischen Promotors in Verbindung mit dem Reportergen und  
20 dem Resistenzgen aus den Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche gewonnen wurden.

15. Mesodermale Zellen nach Anspruch 14, gewonnen unter Verwendung eines  $\alpha$ -MHC-,  $\beta$ -MHC-, Nkx2.5-, ANF- oder Brachyuria-Promotors, wobei die Zelle bevorzugt eine Herzzelle  
25 ist.

16. Verfahren zur Gewinnung sich differenzierender embryonaler Stammzellen, embryonaler Keimbahnzellen und adulter  
30 Stammzellen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend:

- das Einführen zumindest eines Vektors, wie er in einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche definiert

ist, in embryonale Stammzellen, embryonale Keimbahnzellen oder adulte Stammzellen; und

- Selektionieren auf solche Zellen, die diesen Vektor enthalten.

5

17. Verfahren nach Anspruch 16, bei dem der Vektor oder die Vektoren durch Transfektion, Elektroporation, Virusvektoren oder Lipofektion eingeführt wird.

10 18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, wobei das Selektionieren auf die den Vektor enthaltenden Zellen folgende Schritte aufweist:

- Zugabe eines ersten Selektionsmittels zur Selektion von stabil transfizierten Zellen,
- 15 - Nachweis der das Reportergen exprimierenden Zellen;
- Zugabe eines zweiten Selektionsmittels zur Selektion auf die das Reportergen exprimierenden Zellen;
- Gewinnen der aus den Stammzellen oder Keimbahnzellen unter Steuerung des zell- und/oder gewebespezifischen Promotors sich entwickelnden sich differenzierenden oder
- 20 differenzierten Zellen.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das Reportergen für ein fluoreszierendes Protein oder ein Epitop eines Proteins kodiert.

25

20. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei die embryonalen Stammzellen in Form von embryoiden Körperchen oder in Kokultur mit anderen Zellen kultiviert werden.

30

21. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zellen in einer Suspension kultiviert werden und/oder die Zellen als „embryoid bodies“

kultiviert werden.

22. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei Puromycin als zweites Selektionsmittel zur Selektion der das Reportergen exprimierenden Zellen eingesetzt wird und/oder wobei die selektierten Zellen einer Zellsortierung zur weiteren Anreicherung unterzogen werden.
23. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei durch die Verwendung eines für mesodermale, ektodermale oder endodermale Zellen spezifischen Promotors mesodermale, ektodermale oder endodermale Zellen gewonnen werden oder wobei insbesondere durch Verwendung eines herzspezifischen Promotors sich differenzierende Herzzellen gewonnen werden.
24. Zellkultur, die eine zell- oder entwicklungs-spezifische Expression eines Reportergens und eines Resistenzgens zeigt, gewinnbar durch Kultivieren der Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche.
25. Verfahren zur toxikologischen Überprüfung von Substanzen mit den nachfolgenden Schritten:
- Bereitstellen einer Zellkultur aus Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche;
  - Einbringen von Substanzen, deren toxische oder nichttoxische Wirkungen getestet werden sollen, in die Zellkultur;
  - quantitative und/oder qualitative Bestimmung der Fluoreszenz der so erhaltenen Zellen und Vergleich mit Zellen, die ohne die zu untersuchende Substanz kultiviert wurden.



26. Verfahren zur Erzeugung transgener nicht menschlicher Säugetiere, die eine zelltyp- oder entwicklungstypspezifische Expression eines Reportergens und eines Resistenzgens zeigen, umfassend:

5

- Injizieren von Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche in Blastozysten nicht menschlicher Säugetiere; und
- Übertragen der Blastozysten auf Ersatzmütter.

10

27. Transgene nicht menschliche Säugetiere, die durch das Verfahren nach Anspruch 26 gewinnbar sind.

15

28. Verfahren zur Prüfung der Entwicklungsstufen von Säugetierzellen, umfassend die Prüfung der markierten Zellen nach Anspruch 26 unter Verwendung bevorzugt fluorometrischer Verfahren.

20

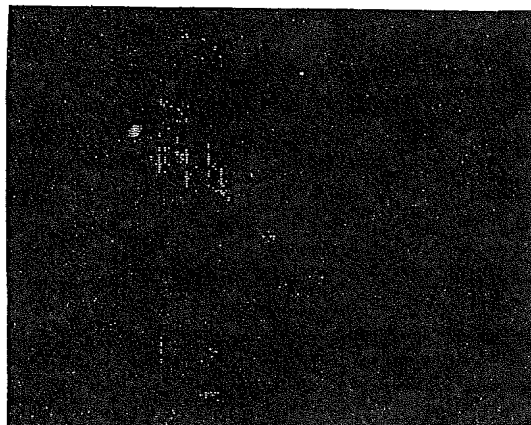
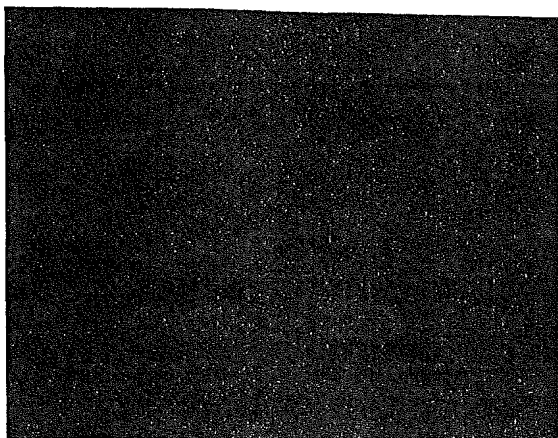
29. Differenzierte Zellen, insbesondere Herzzellen, erhalten aus den Zellen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 15 oder gewonnen durch ein Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 - 23.

25

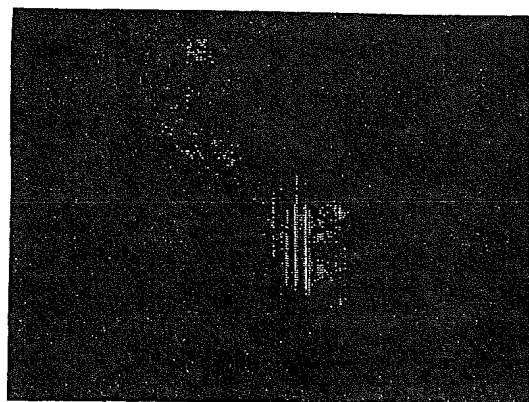
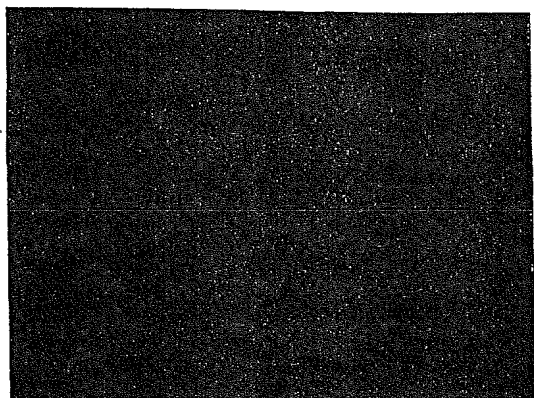
30. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche.

31. Verwendung von Zellen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche in therapeutischen Transplantationsverfahren.

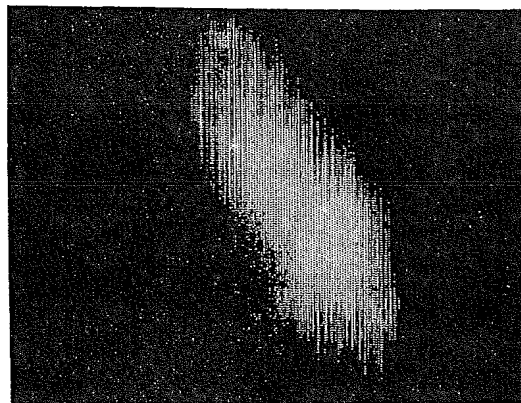
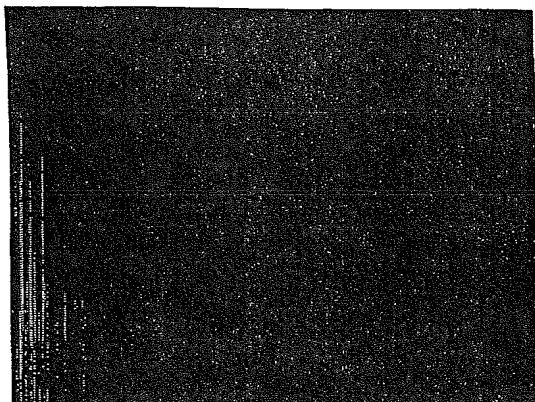
A



B



C



D

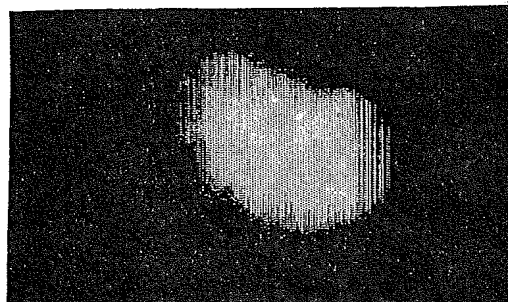
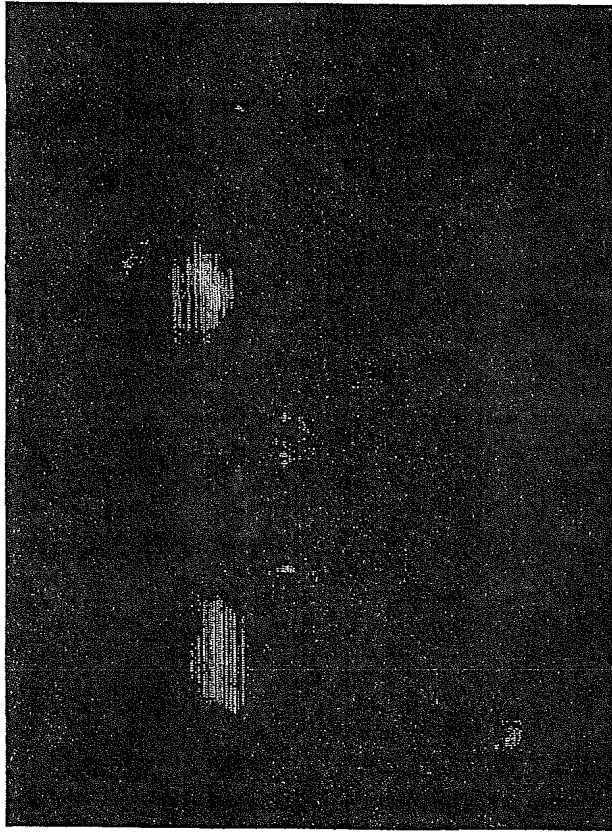


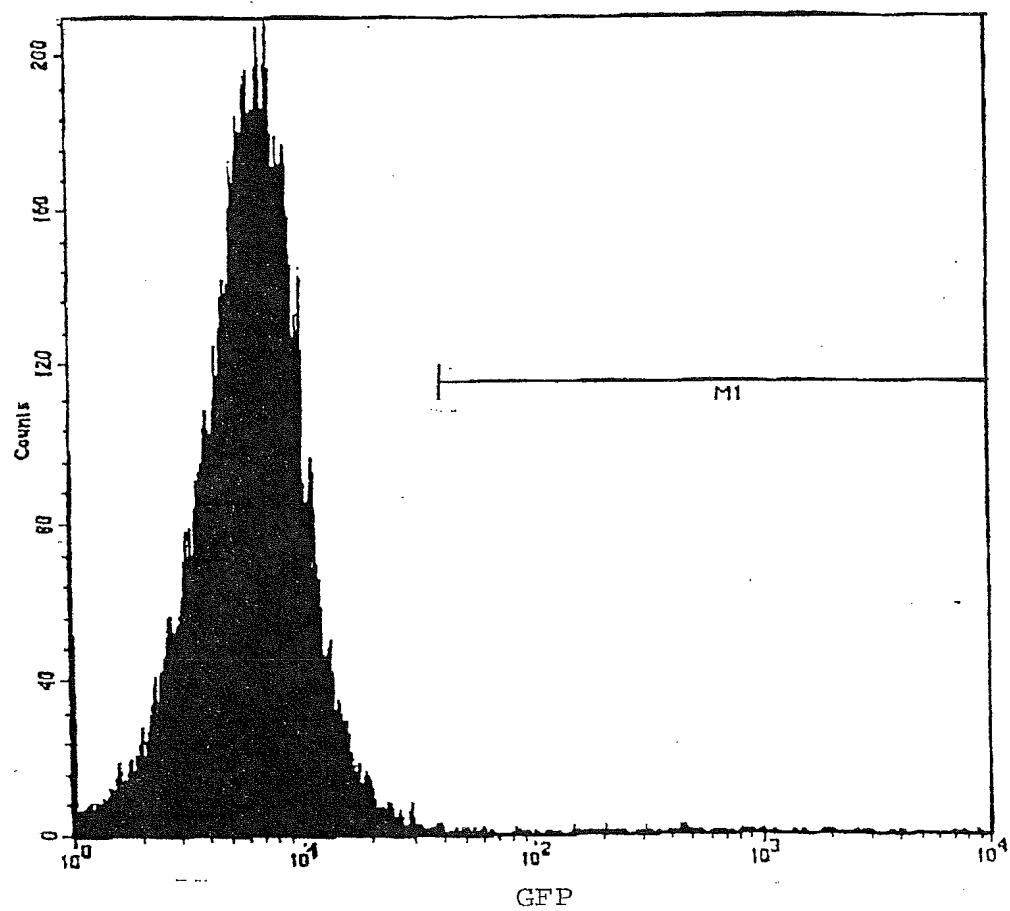
Fig. 1

ERSATZBLATT (REGEL 26)



*Fig. 2*

A



B

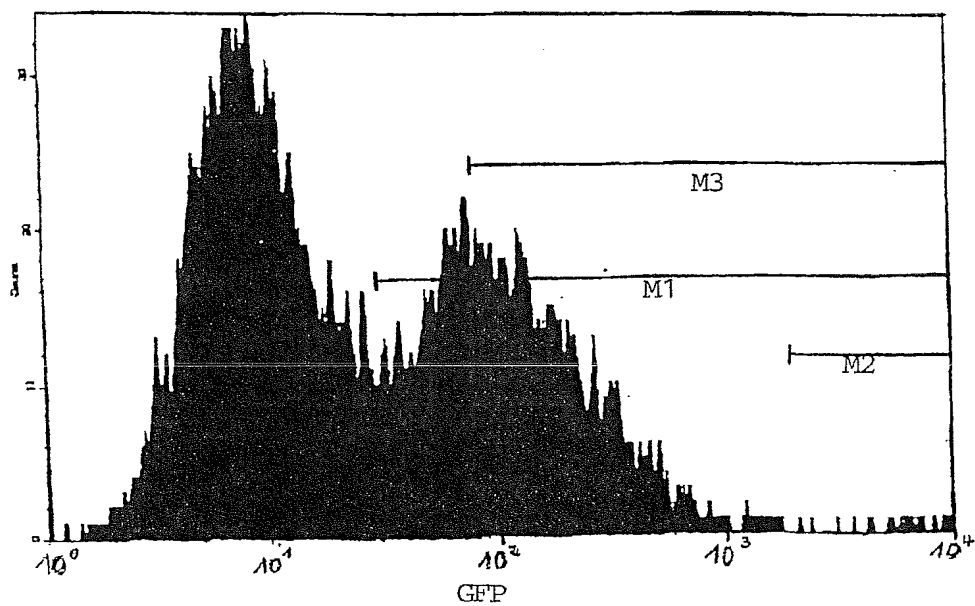


FIG. 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

## Protokol für ES Zell Differenzierung

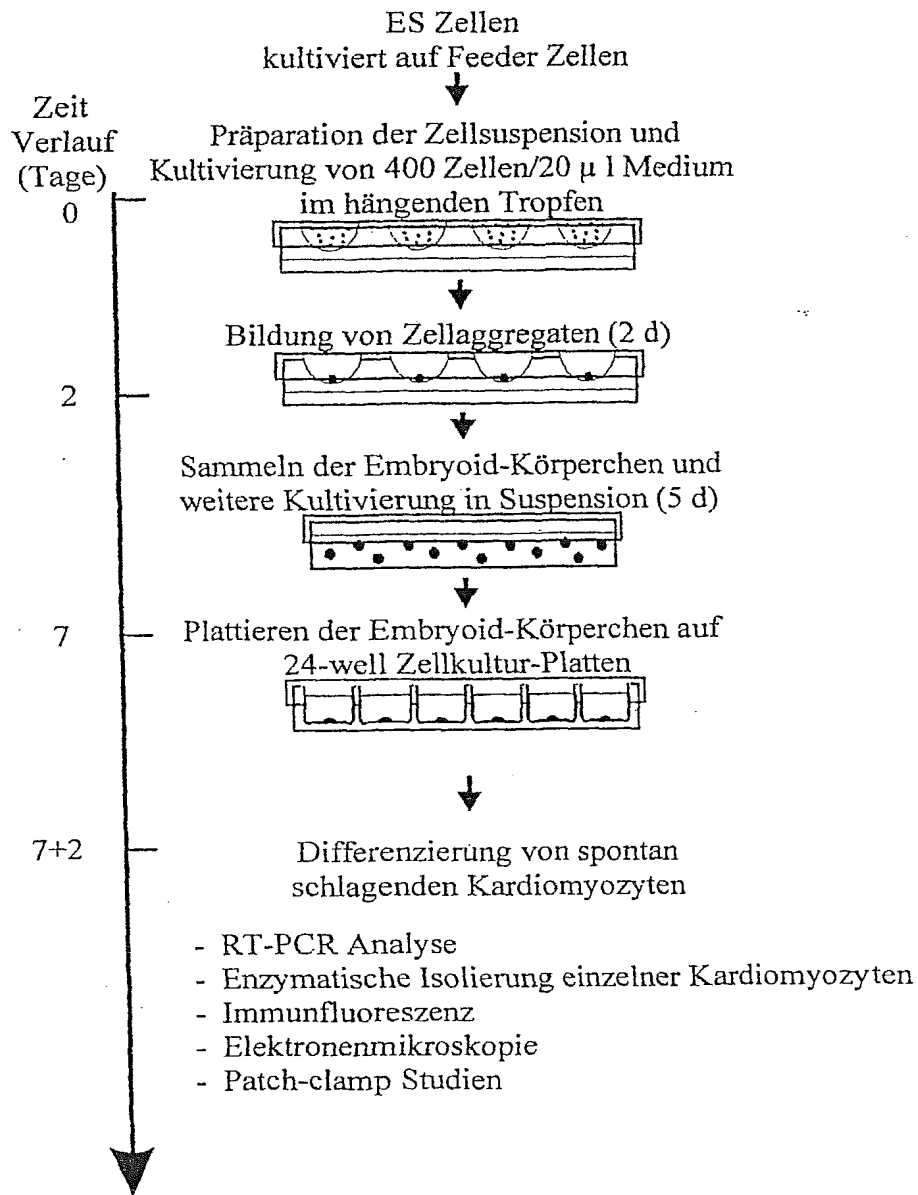


FIG. 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/15337

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/06 A01K67/027 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANDRESSEN CHRISTIAN ET AL: "Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation." STEM CELLS (MIAMISBURG), vol. 19, no. 5, 2001, pages 419-424, XP002197255 ISSN: 1066-5099 the whole document  -/--	1-7, 11-14, 16-21, 24,28, 29,31



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 April 2002

Date of mailing of the international search report

13/05/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nichogiannopoulou, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/15337

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KLUG MICHAEL G ET AL: "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, vol. 98, no. 1, 1996, pages 216-224, XP002142364 ISSN: 0021-9738 cited in the application the whole document	1-31
Y	MUELLER M ET AL: "Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro." FASEB JOURNAL, vol. 14, no. 15, December 2000 (2000-12), pages 2540-2548, XP002197256 ISSN: 0892-6638 cited in the application page 2541, right-hand column, paragraph 2; figure 1	1-31
Y	DE 197 27 962 A (HESCHELER JUERGEN PROF DR UNIV) 14 January 1999 (1999-01-14) cited in the application column 4, line 10; figures 1,2	1-31
A	HESCHELER J ET AL: "Embryonic stem cells: A model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis." CARDIOVASCULAR RESEARCH, vol. 36, no. 2, November 1997 (1997-11), pages 149-162, XP002197257 ISSN: 0008-6363 the whole document	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/15337

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19727962	A	14-01-1999	DE 19727962 A1	14-01-1999
			WO 9901552 A1	14-01-1999
			EP 1002080 A1	24-05-2000



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15337

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N5/06 A01K67/027 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A01K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ANDRESSEN CHRISTIAN ET AL: "Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation." STEM CELLS (MIAMISBURG), Bd. 19, Nr. 5, 2001, Seiten 419-424, XP002197255 ISSN: 1066-5099 das ganze Dokument  ----- -/--	1-7, 11-14, 16-21, 24,28, 29,31

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. April 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/05/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nichogiannopoulou, A

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

itionales Aktenzeichen  
PCT/EP 01/15337

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KLUG MICHAEL G ET AL: "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, Bd. 98, Nr. 1, 1996, Seiten 216-224, XP002142364 ISSN: 0021-9738 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-31
Y	MUELLER M ET AL: "Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro." FASEB JOURNAL, Bd. 14, Nr. 15, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 2540-2548, XP002197256 ISSN: 0892-6638 in der Anmeldung erwähnt Seite 2541, rechte Spalte, Absatz 2; Abbildung 1	1-31
Y	DE 197 27 962 A (HESCHELER JUERGEN PROF DR UNIV) 14. Januar 1999 (1999-01-14) in der Anmeldung erwähnt Spalte 4, Zeile 10; Abbildungen 1,2	1-31
A	HESCHELER J ET AL: "Embryonic stem cells: A model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis." CARDIOVASCULAR RESEARCH, Bd. 36, Nr. 2, November 1997 (1997-11), Seiten 149-162, XP002197257 ISSN: 0008-6363 das ganze Dokument	1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15337

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19727962 A	14-01-1999	DE 19727962 A1	14-01-1999
		WO 9901552 A1	14-01-1999
		EP 1002080 A1	24-05-2000
<hr/>			

